



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE UM SISTEMA DE  
LIBERTAÇÃO DE ANTIBIÓTICO DE QUITOSANO PARA UTILIZAÇÃO EM  
INFEÇÕES OCULARES SUPERFICIAIS

INÊS MARTINS RITA DOS SANTOS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Doutora Esmeralda Sofia Costa Delgado

Dr. Henrique Mário da Silva Armés

ORIENTADOR

Dr. Henrique Mário da Silva Armés

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

2014

LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE UM SISTEMA DE  
LIBERTAÇÃO DE ANTIBIÓTICO DE QUITOSANO PARA UTILIZAÇÃO EM  
INFEÇÕES OCULARES SUPERFICIAIS

INÊS MARTINS RITA DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Doutora Esmeralda Sofia Costa Delgado

Dr. Henrique Mário da Silva Armés

ORIENTADOR

Dr. Henrique Mário da Silva Armés

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

2014

LISBOA



Aos meus pais e à minha irmã.



## **Agradecimentos**

Aos meus pais pelo apoio incondicional e confiança demonstrada durante todos os anos de estudo.

À minha irmã por me ter sempre incentivado a seguir novos caminhos e a enfrentar o desconhecido.

Aos meus amigos por estarem sempre presentes, e pelos bons momentos que passámos durante todos estes anos.

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira pelo apoio prestado na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Henrique Armés pela orientação e oportunidade que me ofereceu.

A todos os profissionais do Hospital Veterinário de São Bento, médicos e enfermeiros, por toda a ajuda e conhecimentos transmitidos.

Às Doutoras Margarida, Ana Duarte, Manuela Oliveira e Carla Carneiro pelo apoio na realização da parte prática deste trabalho nos laboratórios da FMV/CIISA.

Aos doutores Eduardo Pires e Luís Pinto, à doutora Ana Paula Serro e a Raquel Galante pela oportunidade e ajuda na realização deste trabalho.





## **Resumo**

### **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE UM SISTEMA DE LIBERTAÇÃO DE ANTIBIÓTICO DE QUITOSANO PARA UTILIZAÇÃO EM INFEÇÕES OCULARES SUPERFICIAIS.**

As doenças oculares externas causadas por infecções bacterianas secundárias são comuns nos cães. Devido às características próprias dos olhos, ao pequeno volume lacrimal e à contínua drenagem e eliminação da mesma, o tratamento passa muitas vezes pela aplicação frequente de colírios. Cada vez mais se desenvolvem métodos que permitem uma libertação contínua de fármacos de forma a aumentar a adesão dos donos dos animais à terapêutica e assim, não comprometer os tratamentos. Neste trabalho foram avaliadas as características físicas, os índices de absorção e de libertação dos discos de quitosano incorporados com três antibióticos (Levofloxacin, Gentamicina e Ceftriaxona) em diferentes concentrações. Verificou-se a existência de heterogeneidade entre discos e que o índice de absorção era relativamente grande quando comparado ao de outros estudos, facto possivelmente decorrente da origem dos mesmos. A libertação segundo o método de TSA permitiu verificar que as zonas de inibição durante 24 horas foram superiores ao intervalo de referência para os discos de Levofloxacin e Gentamicina. Devido a limitações técnicas, a quantidade de discos analisada foi pequena e nem todos os discos foram avaliados nos diferentes testes. São assim necessários mais estudos e aperfeiçoamento dos pensos oculares antes da sua utilização na clínica de pequenos animais.

**Palavras-chave:** Doenças oculares, infecções bacterianas, pensos oculares, antibióticos.



## **Abstract**

### **PRELIMINARY DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A SYSTEM FOR RELEASE OF ANTIBIOTICS BASED ON CHITOSAN FOR USE IN SUPERFICIAL OCULAR INFECTIONS**

The external ocular diseases caused by secondary bacterial infections are common in dogs. Due to the characteristics of the eyes, like the residual tear volume and continuous drainage, the treatment often depends on the frequent use of eye drops. The evaluation studies on the methods for continuous drug release in order to enhance the compliance of the pet owners to not compromise the treatments have become more frequent. In this study were analysed, in terms of physical characteristics, rate of absorption and release chitosan inserts incorporated with three antibiotics (Levofloxacin, gentamicin and ceftriaxone) at different concentrations. In this work it was found that there was heterogeneity among discs and the absorption rate was relatively increased when compared to other studies, a fact due probably to its origin. The antibiotic release according to the TSA method has shown that the inhibition zone was larger than the reference interval for the levofloxacin and gentamicin discs during 24 hours. Technical limitations diminished the amount of discs analysed and not all discs were evaluated in the different tests. More studies and improvement of the ocular inserts would be needed before its clinical use.

**Keywords:** Eye diseases, bacterial infections, ocular inserts, antibiotic.



## Índice geral

Índice de figuras .....	xii
Índice de tabelas .....	xii
Índice de gráficos.....	xiii
Lista de abreviaturas, siglas, símbolos e unidades.....	xiv
Relatório de atividades de estágio .....	1
I. Revisão Bibliográfica.....	3
I.1 Introdução.....	3
I.2 Aparelho visual.....	3
I.2.1. Anatomia .....	3
I.2.2 Doenças oculares externas com envolvimento bacteriano .....	6
I.2.2.1 Blefarite .....	6
I.2.2.2 Conjuntivite .....	6
I.2.2.3 Queratite .....	7
I.2.3 Microbiota em doenças oculares .....	9
I.2.3.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	11
I.2.3.2 <i>Streptococcus</i> spp. ....	11
I.2.3.3 <i>Pseudomonas</i> spp. ....	12
I.2.4 Vias de administração ocular.....	13
I.2.4.1 Aplicação tópica.....	13
I.2.4.2 Aplicação subconjuntival e outras vias.....	14
I.2.5 Fármacos antimicrobianos .....	15
I.2.5.1 Aminoglicosídeos .....	17
I.2.5.2 Fluoroquinolonas.....	19
I.2.5.3 Cefalosporinas.....	21
I.3 Biomateriais.....	23
I.4 Quitosano .....	23
I.4.1 Estrutura química .....	23
I.4.2 Métodos de preparação.....	24
I.4.3 Características do quitosano .....	25
I.4.3.1 Características físico-químicas.....	25
I.4.3.2 Biodegradabilidade.....	26
I.4.3.3 Biocompatibilidade .....	27
I.4.3.4 Mucoadesão .....	28
I.4.3.5 Aumento da permeabilidade a fármacos.....	28
I.4.4 Aplicações do quitosano.....	29
I.4.4.1 Cicatrização de feridas.....	29
I.4.4.2 Hemostático .....	30

I.4.4.3 Antimicrobiano.....	30
I.4.4.4 Anticolesterol .....	31
I.4.4.5 Engenharia dos tecidos .....	32
I.4.4.6 Sistemas de libertação de fármacos .....	32
I.4.4.7 Outras aplicações.....	33
I.5 Sistemas de libertação de fármacos oculares .....	35
I.5.1 Barreiras a ultrapassar na libertação de fármacos tópicos oculares.....	35
I.5.2 Mecanismos de libertação controlada de fármacos .....	36
I.5.2.1 Pró-fármacos .....	37
I.5.2.2 Soluções e hidrogéis .....	37
I.5.2.3 Promotores de permeabilidade .....	38
I.5.2.4 Sistemas coloidais .....	38
I.5.2.5 Iontoforese .....	41
I.5.2.6 Lentes de contacto .....	41
I.5.2.7 Implantes.....	41
I.5.2.8 Pensos oculares .....	41
II. Objetivos.....	43
III. Material e métodos .....	43
III.1 Material.....	43
III.2 Métodos .....	43
III.2.1 Preparação dos pensos .....	43
III.2.2 Avaliação das características físicas .....	44
III.2.3 Teste de absorção de água.....	44
III.2.4 Determinação do pH .....	44
III.2.5 Estudos microbiológicos .....	45
IV. Resultados.....	48
IV.1 Características físicas.....	48
IV.2 Teste de absorção de água.....	49
IV.3 Determinação de pH .....	51
IV.4 Estudos microbiológicos .....	52
V. Discussão.....	55
VI. Conclusões.....	58
VII. Bibliografia.....	59
Anexo 1 – Atividades desenvolvidas durante o estágio .....	69

## Índice de figuras

Figura 1: Estrutura interna do olho canino.....	3
Figura 2: Estrutura química da gentamicina.....	18
Figura 3: Estrutura química da levofloxacina .....	20
Figura 4: Estrutura química da ceftriaxona .....	22
Figura 5: Estrutura primária do quitosano.....	24
Figura 6: Imagem da zona de inibição obtida para discos padrão e de quitosano com 5 µg levofloxacina em cultura de <i>P.aeruginosa</i> e com 10 µg gentamicina em cultura de <i>S.aureus</i> . ....	53

## Índice de tabelas

Tabela 1: Microrganismos identificados em canídeos com doença ocular externa .....	10
Tabela 2: Vias sugeridas para administração no olho .....	15
Tabela 3: Fármacos antibacterianos para uso tópico no olho .....	16
Tabela 4: CMI <sub>90</sub> da Gentamicina em mg/L .....	19
Tabela 5: CMI <sub>90</sub> para levofloxacina, ofloxacina e ciprofloxacina em mg/L .....	21
Tabela 6: Número de discos utilizados na primeira etapa dos testes microbiológicos. ....	46
Tabela 7: Número de pensos utilizados na segunda etapa dos testes microbiológicos. ....	47
Tabela 8: Caracterização de pensos de quitosano com diferentes concentrações de antibiótico quanto ao diâmetro, espessura e peso. ....	48
Tabela 9: Média, variância e desvio padrão do diâmetro, da espessura e da massa dos discos avaliados. ....	49
Tabela 10: Percentagem e quantidade teórica de fármaco em cada disco de quitosano. ....	49
Tabela 11: Médias do índice de absorção de água a diferentes tempos após o protocolo ter tido início dos discos produzidos na primeira fase.....	50
Tabela 12: Valores e médias do índice de absorção de água em tempos determinados, após iniciado o protocolo para os discos Branco2 e levofloxacina a 10% e a 30%.....	51
Tabela 13: pH das soluções usadas para realização do teste de absorção de água. ....	52
Tabela 14: Diâmetro da zona de inibição obtida com discos padrão e de quitosano na mesma quantidade de fármaco para <i>S.aureus</i> e <i>P.aeruginosa</i> . ....	52
Tabela 15: Diâmetro da zona de inibição das soluções de levofloxacina e de gentamicina depositadas à superfície e num poço no agar.....	53
Tabela 16: Diâmetros das zonas de inibição obtidos com os discos padrão e de quitosano com diferentes concentrações de antibiótico. ....	54
Tabela 17: Frequência relativa dos casos clínicos observados no serviço de consultas. ....	69
Tabela 18: Frequência relativa dos casos clínicos observados no serviço de cirurgia.....	69
Tabela 19: Frequência relativa dos casos clínicos observados no serviço de internamento.....	70

## Índice de gráficos

Gráfico 1: Representação da concentração plasmática de fármacos após administração ao longo do tempo e factores a ter em conta na avaliação da eficácia. ....	17
Gráfico 2: Representação dos índices de absorção de discos de quitosano produzidos na primeira fase em tempos pré-determinados .....	50
Gráfico 3: Representação dos índices de absorção de discos de quitosano em tempos pré-determinados.....	51



## Lista de abreviaturas, siglas, símbolos e unidades

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
AUC	Area under the curve; Área sob a curva
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
C <sub>máx</sub>	Concentração máxima
CMI	Concentração mínima inibitória
Da	Dalton
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
GD	Grau desacetilação
HCL	Ácido clorídrico
HDL	<i>High density lipoproteins</i>
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IL	Interleucina
kDa	Quilodalton
LDL	<i>Low density lipoproteins</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	miligrama
mL	mililitro
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	nanómetro
PM	Peso molecular
PVP	Polivinilpirrolidona
µm	micrómetro
µL	microlitro
TSA	Teste sensibilidade a antibióticos
°C	Graus centígrados
%	Porcentagem
B	Beta
®	Marca registada

## **Relatório de atividades de estágio**

Foi realizado um estágio extracurricular no Hospital Veterinario Canis, em Girona durante três meses e meio. Durante este período, e num horário das 9 às 15h ou das 15h às 21h durante a semana e fins-de-semana alternados, foram acompanhados casos no serviço de medicina interna, imagiologia e cirurgia.

O estágio curricular que serviu de base para a realização da presente Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi realizado na área de Medicina e Cirurgia de Animais de Companhia, no Hospital Veterinário de São Bento sob orientação do Professor Doutor Henrique Armés.

O estágio foi realizado no período compreendido entre 1 de Fevereiro e 15 de Julho de 2013 e teve a duração total de 890 horas. O Hospital Veterinário de São Bento encontra-se dividido nas áreas de Cirurgia, Consulta externa e Internamento, ocorrendo rotação semanal. Assim, foram desenvolvidas atividades nas áreas de cirurgia, medicina interna, profilaxia, imagiologia, análises clínicas e internamento.

O estágio no serviço de consultas externas ocorreu durante 7 semanas no horário das 10h-13h e das 14h-19h perfazendo um total de 256 horas onde foram acompanhados 137 casos clínicos. Em consulta, as atividades desenvolvidas consistiram na contenção física dos animais, colheita de material para análise, acompanhamento na realização de ecografias, ecocardiografias, radiografias, preparação e administração de fármacos e acompanhamentos pós-cirúrgicos como mudanças de pensos e remoção de pontos de sutura. Foi possível acompanhar casos clínicos em diferentes áreas, sendo a mais frequente a vacinação (n=41 casos, FR:29.9%), seguida pela gastroenterologia (n=16, FR: 11.7%) e dermatologia (n=15, FR:11%). Dos casos seguidos 68% corresponderam a cães, 29% a gatos e 3% a espécies exóticas (Tabela 17, anexo1).

A rotação pelo serviço de internamento decorreu durante 9 semanas, de segunda-feira a sexta-feira, no horário das 9h30 -14h e das 15h -19h, fins-de-semana no horário das 9h30-14h e duas noites no horário das 22h-8h, correspondendo ao total de 430 horas. As atividades desenvolvidas consistiam em realizar a monitorização geral dos pacientes, preparação e administração da medicação, cuidados básicos de higiene, alimentação, recolha de amostras para análise e colocação de cateteres endovenosos. Foram acompanhados 221 casos, sendo

que 20,4% estavam relacionados com cuidados pós-cirúrgicos, 15,8% com nefrologia e urologia, 13,6% com gastroenterologia e 12,2% com traumatologia (Tabela 18, Anexo1).

Na área da cirurgia, o estágio compreendeu 7 semanas num total de 204 horas, no horário das 10-14 e das 16-18h, onde foram desempenhados procedimentos pré e pós-cirúrgicos, função de anestesista ou de observador. Foram acompanhados 93 casos clínicos, 61% dos quais cães, 35% Gatos e 4% espécies exóticas. As cirurgias de tecidos moles foram as de maior relevo correspondendo a um total de 63%, sendo as mais frequentes as orquiectomias, ovariectomias e nodulectomias. As restantes corresponderam a cirurgias ortopédicas (15%), odontológicas (10.8%), oftalmológicas (6.5%) e relacionadas com a realização de meios complementares de diagnóstico como a endoscopia (4.3%) (Tabela 19, Anexo1).

## I. Revisão Bibliográfica

### I.1 Introdução

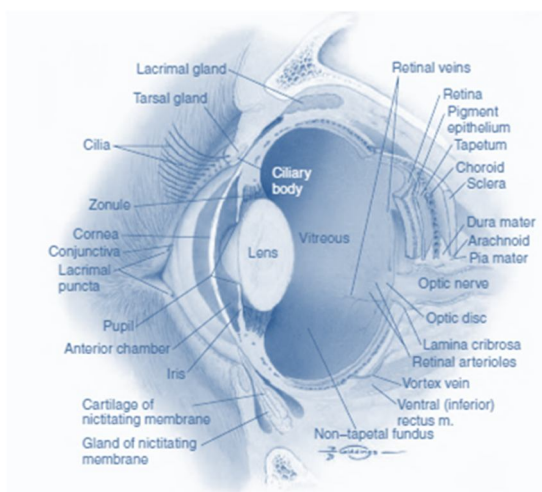
As doenças oculares externas com envolvimento secundário de bactérias são frequentes no cão. O tratamento envolve a eliminação da causa primária e a aplicação de tratamento tópico por gotas e/ou pomadas. Em casos mais graves pode ser necessária intervenção cirúrgica. A aplicação tópica de gotas implica, muitas vezes, um tratamento frequente devido às características da formação e drenagem da película lacrimal. Este facto pode diminuir a adesão ao tratamento por parte dos donos e diminuir a eficácia do tratamento. Ao longo do tempo, vários investigadores têm trazido à luz do conhecimento, vários métodos de libertação contínua de fármacos que, idealmente, permitiriam apenas uma ou duas instilações diárias e teriam características adequadas para aplicação a nível ocular (Sánchez, 2003). O quitosano é um biomaterial com características como a bioadesão, aumento da permeabilidade de outros fármacos, biocompatibilidade e a não toxicidade que permitem a sua utilização em medicina como constituinte de matrizes para libertação de agentes terapêuticos, nomeadamente, antibióticos.

### I.2 Aparelho visual

#### I.2.1. Anatomia

O aparelho visual compreende as pálpebras, membrana nictitante, conjuntiva, globo ocular, sistema lacrimal e órbita, sendo o olho um órgão único em termos anatómicos e fisiológicos (Figura 1).

Figura 1: Estrutura interna do olho canino (Adaptado de Slatter, 2001)



As pálpebras possuem a função de proteger o globo ocular. Esta tarefa é conseguida de várias formas que incluem o efeito sensorial e protetor dos cílios na pálpebra superior, proteção física contra traumas, a secreção pelas glândulas tarsais e células caliciformes existentes na conjuntiva da camada lipídica exterior e mucopolissacarídea interna da película lacrimal e o fluxo das lágrimas através do ducto nasolacrimal para eliminação de corpos estranhos à superfície e distribuição uniforme da película lacrimal sobre a córnea (Maggs, 2001c; Samuelson, 2013). As pálpebras são formadas por três camadas: a mais externa corresponde à pele que contém folículos pilosos, pestanas (na pálpebra superior) e glândulas sebáceas; a camada média que apresenta músculo, glândulas tarsais de meibomius e tecido conjuntivo e, a mais interna, é a conjuntiva (Crispin, 2005c).

Os animais possuem ainda uma terceira pálpebra denominada de membrana nictitante. Esta é constituída por estroma de tecido conjuntivo que suporta tecido glandular e linfóide e, por uma cartilagem em forma de T revestida em ambas as superfícies por conjuntiva. O pestanejar normal e os movimentos da membrana nictitante permitem distribuir a película lacrimal numa camada fina e uniforme e ajudar à drenagem lacrimal (Crispin, 2005c).

O sistema lacrimal é constituído por dois componentes: o componente secretor e componente excretor (Crispin, 2002c). O primeiro permite a formação da película lacrimal que cobre o epitélio conjuntival e corneal, enquanto o segundo consiste nas aberturas lacrimais superior e inferior e respetivos canalículos que se juntam no saco lacrimal e que continuam pelo ducto nasolacrimal até à cavidade nasal. A película lacrimal é formada por três camadas e possui cerca de 7 µm. A camada superficial lipídica é composta por fosfolípidos, evita a evaporação da camada aquosa e permite a formação de uma barreira nas margens das pálpebras que evita o extravasamento. A camada média consiste, maioritariamente, em água com eletrólitos, glucose, glicoproteínas e proteínas lacrimais como imunoglobulinas, albumina e lisozima, sendo produzida pelas glândulas lacrimais e terceira pálpebra (Samuelson, 2013). Esta camada contribui para a eliminação de material estranho e de bactérias do saco conjuntival, lubrifica as pálpebras e a membrana nictitante, constitui um meio para a passagem de oxigénio, permite a distribuição de células inflamatórias e de anticorpos para a córnea quando necessário e, por fim, forma uma superfície lisa e regular da córnea para uma ótima eficiência ótica. A camada interna de mucina consiste em glicoproteínas hidratadas secretadas pelas células caliciformes conjuntivais, contribuindo para a lubrificação e hidratação da córnea e da conjuntiva (Miller, 2001; Samuelson, 2013). O pH normal da película lacrimal canina ronda os 6,8-8,0, apresentando um valor médio de 7,5, enquanto nos felinos encontra-se entre 7,2 e 7,8 (Crispin, 2002c).

A conjuntiva é a membrana mucosa mais exposta, sendo móvel e vascularizada. Esta estrutura cobre a superfície interna das pálpebras (conjuntiva palpebral), a membrana nictitante (conjuntiva da membrana nictitante) e a porção anterior do globo ocular, sendo contínua com o epitélio corneal e do limbo (conjuntiva bulbar). A conjuntiva é importante na produção da película lacrimal, proteção imunológica, nos movimentos oculares e na cicatrização corneal. O espaço delimitado pela conjuntiva bulbar e palpebral denomina-se saco conjuntival. É constituída pela película lacrimal, epitélio e substância própria. A substância própria apresenta uma camada glandular superficial que contém numerosos folículos linfáticos responsáveis pela proteção imunológica e uma camada fibrosa mais profunda onde se localizam os nervos e vasos sanguíneos. O epitélio é estratificado não queratinizado e colunar, que suporta numerosas células caliciformes produtoras de mucina (Maggs, 2001a; Samuelson, 2013)

A porção mais externa do globo ocular corresponde à túnica fibrosa e é constituída por uma porção opaca denominada esclera e por uma porção transparente chamada córnea. A córnea tem como funções, o suporte de conteúdos intraoculares, a refração da luz e a transmissão da luz (Samuelson, 2013), apresentando-se dividida em cinco camadas: a película lacrimal, o epitélio, o estroma, a membrana Descemet's e o endotélio (Barnett, 2006b). O epitélio é constituído por camadas de células organizadas e unidas e representa uma barreira à passagem de compostos ionizados e hidrofílicos, uma vez que as uniões existentes entre as células evitam a entrada pela via paracelular. É formado, mais externamente, por células escamosas sobre células poliédricas e uma camada mais interna de células colunares que produzem a membrana basal. O epitélio une-se ao estroma por hemidesmossomas (Maggs, 2001a). O estroma representa 90% da córnea e é hidrofílico, sendo uma barreira seletiva para substâncias lipofílicas (Sánchez, 2003). A córnea é ricamente suprida com nervos sensoriais, principalmente recetores de dor, na camada mais superficial (Samuelson, 2013).

A transparência da córnea deve-se a vários factores, como a não existência de vasos sanguíneos ou de pigmento, controlo do conteúdo de água, superfície ótica lisa e fibras de colagénio no estroma organizadas de forma regular (Samuelson, 2013). Sendo avascular, está dependente do humor aquoso e da película lacrimal para nutrição. O metabolismo da glucose dependente de oxigénio permite fornecer energia para os tecidos da córnea. O controlo do fluxo de água ocorre por bombas endoteliais que funcionam contra um gradiente de concentração nas células endoteliais e epiteliais. Deste modo, a privação em oxigénio leva à glicólise anaeróbia com acumulação de ácido láctico e água formando edema na córnea (Maggs, 2001b).

Todos os constituintes do aparelho ocular podem apresentar processos infecciosos. Neste trabalho são focados apenas, os processos que ocorrem na porção mais anterior do globo ocular incluindo as pálpebras, conjuntiva e córnea.

## **I.2.2 Doenças oculares externas com envolvimento bacteriano**

### **I.2.2.1 Blefarite**

Blefarite é o termo utilizado para definir a inflamação das pálpebras, sendo pouco frequente em animais domésticos (Barnett, 2006c). As causas podem ser: parasitárias, infecciosas (bacterianas, fúngicas), imunomediadas, alérgicas, secundárias a irritação ocular ou relacionadas com o sistema endócrino.

As infecções das margens palpebrais ocorrem frequentemente em cães e, normalmente, têm origem bacteriana, sendo o *Staphylococcus aureus*, muitas vezes responsável, contudo, também são associados a um trauma inicial. Podem estar relacionados com problemas dermatológicos primários e com envolvimento conjuntival secundário, ou podem acompanhar processos na superfície ocular (blefaroconjuntivite) (Petersen-Jones, 2002). Os pacientes podem apresentar como sinais clínicos, dependendo da condição primária, do grau e da gravidade: eritema, quemose, prurido e dor (Maggs, 2001c) evidenciada por blefarospasmo e corrimento ocular, alopecia, erosões ou formação de crostas por autotraumatismo (Barnett, 2006c). A inflamação do tecido glandular das pálpebras, como das glândulas de meibomius, pode ser aguda ou crônica e ser acompanhada por blefarite ou conjuntivite (Petersen-Jones, 2002). O tratamento local de blefarite consiste na aplicação de compressas quentes e na utilização de um agente antisséptico permitindo eliminar os detritos, reduzir a carga bacteriana e estabilizar a película lacrimal e na utilização de preparações tópicas de antibióticos corretamente selecionados (Donaldson, 2011).

### **I.2.2.2 Conjuntivite**

Conjuntivite corresponde à inflamação da conjuntiva e é, provavelmente, a doença ocular mais comum, mas pode ser difícil de identificar a sua etiologia. É classificada de acordo com a etiologia, duração e aparência (Maggs, 2001a), podendo ser 1ª (sem envolvimento de outras estruturas oculares) ou 2ª a qualquer outra doença ocular, aguda ou crônica, unilateral ou

bilateral e afetar qualquer idade incluindo neonatos. No cão é frequentemente secundária e, muitas vezes, autolimitante, não necessitando de tratamento (Crispin, 2005a).

A conjuntivite primária pode dever-se a agentes infecciosos como vírus, substâncias irritantes como químicos, pó, vento ou ter origem alérgica ou autoimune. A conjuntivite secundária pode ocorrer por sobrecrecimento bacteriano (estafilococos e estreptococos), irritação mecânica por defeitos nas pálpebras (ectrópion, entrópion) ou na posição dos cílios (triquíase, distiquíase, cílios ectópicos), problemas da película lacrimal, dacriocistite e problemas orbitais ou periorbitais (Crispin, 2002a). De acordo com a duração, pode ser aguda, normalmente unilateral e resolvendo-se em poucos dias, podendo apresentar sinais como: hiperémia, quemose (edema conjuntival), lacrimejo e corrimento (seroso, mucoide, purulento, hemorrágico ou combinação) ou crônica, normalmente secundária e bilateral, com espessamento e formação de folículos e diminuição da secreção. É descrita como não dolorosa, mas causa irritação podendo ser acompanhada por lacrimejo e blefarospasmo (Crispin, 2005a; Barnett, 2006a).

Sempre que possível, um diagnóstico etiológico deve ser efetuado para uma escolha terapêutica adequada. A conjuntivite bacteriana em cães é causada, geralmente, por bactérias gram-positivas, sendo os isolados mais frequentes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Streptococcus* spp. (Maggs, 2001a). O tratamento de uma conjuntivite bacteriana depende de se identificar e remover a causa primária, implicando a limpeza do olho com soro fisiológico ou agentes de limpeza ocular, um antibiótico tópico e a prevenção de traumatismo com a colocação de um colar isabelino. Na presença de microrganismos gram-positivos, o gel de ácido fusídico é utilizado como primeira escolha e o cloranfenicol tópico como segunda. Se existirem bactérias gram-negativas a utilização de gentamicina é recomendada e quando estão presentes culturas mistas deve ser utilizada uma associação de antimicrobianos (Maggs, 2001a). Para infecções confirmadas por *Staphylococcus* spp., a utilização tópica de corticosteroides permite reduzir a hipersensibilidade às toxinas (Crispin, 2005a).

### **I.2.2.3 Queratite**

As principais respostas à lesão da córnea são edema, vascularização e pigmentação. A dor é um sinal importante e acompanha as principais formas de queratite, qualquer que seja a causa com blefarospasmo, fotofobia e lacrimejo (Crispin, 2005b).



A queratite consiste numa inflamação da córnea e pode ser classificada atendendo à sua etiologia, localização ou profundidade. Pode ser acompanhada por conjuntivite e, em casos mais graves e crónicos por uveíte, que pode requerer tratamento adicional. Quanto à sua etiologia pode ser infecciosa, alérgica, imuno-mediada, associada a doença sistémica, trauma exógeno ou endógeno, alteração da película lacrimal como queratoconjuntivite seca, lesão neurotrópica ou de causa desconhecida (Maggs, 2001b).

O epitélio corneal é uma barreira eficaz contra bactérias, contudo, quando ocorre lesão e o estroma fica exposto, este torna-se um local potencial para adesão bacteriana, podendo ocorrer infeção secundária e, por progressão formarem-se úlceras mais profundas. As queratites ulcerativas podem ter diferentes etiologias que incluem: trauma mecânico direto (por unhas ou corpos estranhos), irritação por lesão térmica, luz ultravioleta, substâncias ácidas ou alcalinas, defeitos na película lacrimal, tumores ou alterações das pálpebras (como entrópion ou cílios ectópicos), imunomediada, neurogénica por lesão de nervos (neuroparalítica – VII ou neurotrófica -V) e distrofia (Crispin, 2005b). Os sinais clínicos incluem dor, edema corneal (implicando infeção quando é difuso), vascularização e úlcera corneal. As úlceras quanto à profundidade podem ser superficiais com pequenas erosões, intersticiais com perda do epitélio e uma parte do estroma ou profundas (Crispin, 2002b). Úlceras simples estão, normalmente, associadas a traumas menores, são superficiais e resolvem-se rapidamente sem cicatriz, sendo que os antibióticos tópicos podem não ser necessários. Úlceras complicadas envolvem o estroma e persistem por mais de 7 dias (Maggs, 2001b). Em úlceras crónicas ou infetadas, proteases, nomeadamente, metaloproteínases da matriz que são enzimas que digerem o colagénio e proteoglicanos, podem induzir a ruptura de uma úlcera simples. Estas enzimas são produzidas pelo epitélio a cicatrizar, leucócitos ou bactérias (*Pseudomonas* spp.) e a sua ação é potenciada por corticosteroides. A dissolução rápida da córnea sob influência das proteases denomina-se *queratohelcose* (Maggs, 2001b).

Uma úlcera profunda corresponde à perda de, aproximadamente, metade ou mais da espessura corneal e, pode ser o resultado de uma lesão inicial ou complicação, podendo ser progressiva ou não progressiva. Considerando estas últimas, o tratamento pode ser médico ou cirúrgico, com a formação de um flap conjuntival. Nas úlceras progressivas e nos descemetocélios é sempre indicado o tratamento cirúrgico (Maggs, 2001b). A prescrição de antibiótico é também importante, podendo implicar tratamentos frequentes espaçados por uma hora durante os primeiros dias. Inicialmente, tendo como base a citologia e no caso de bactérias gram-positivas pode-se utilizar uma preparação com três antibióticos incluindo bacitracina ou cloranfenicol, enquanto em infeções com gram-negativas é recomendada a utilização de

gentamicina ou tobramicina e, em infecções mistas pode-se utilizar uma combinação de antibióticos ou ciprofloxacina, ofloxacina ou outra fluoroquinolona, como a levofloxacina tópica (Glaze, 2012). Por vezes são utilizadas soluções hiperconcentradas como a de gentamicina a 14,3 mg/mL (Riviere & Spoo, 2001). Normalmente, as úlceras progressivas são acompanhadas por uveíte, pelo que, se deve efetuar tratamento sintomático desta, assim como se deve utilizar antiproteases. Se existir a possibilidade de perfuração da córnea, deve-se utilizar um pedículo conjuntival, colocado sob anestesia geral e deixado durante 4 semanas antes de ser seccionado (Maggs, 2001b). Como conclusão deve-se, inicialmente, determinar a causa da úlcera e eliminá-la, evitar complicações secundárias como infecções bacterianas utilizando antibióticos de amplo espectro (Brooks, 2010), evitar a progressão lesional com fármacos específicos (inibidores das proteases) ou técnicas cirúrgicas, aplicar midriáticos e conferir condições para uma cicatrização correta e manutenção da integridade corneal (Maggs, 2001b).

### **I.2.3 Microbiota em doenças oculares**

O diagnóstico de doenças oculares implica a realização da anamnese, exame físico e exame oftálmico onde, entre outras análises, são recolhidas amostras para citologia, cultura e testes de sensibilidade antibacteriana. Estas amostras são recolhidas com uma zaragatoa estéril humedecida em solução salina a partir do saco conjuntival, antes da aplicação de colírios (Crispin, 2005a). As culturas bacterianas são realizadas, normalmente, caso o tratamento antibacteriano inicial não tenha tido sucesso, pois se forem realizadas como procedimento inicial podem revelar microrganismos presentes na flora normal ou agentes comuns (Maggs, 2001d).

Segundo um estudo realizado em Lisboa, com amostras de 76 canídeos que apresentavam sinais de doença ocular externa, as bactérias mais predominantes foram as gram-positivas (76.9%), sobretudo do género *Staphylococcus* spp. (45%), sendo as espécies mais frequentes *S. aureus*, *Staphylococcus pseudointermedius* e *Streptococcus canis* (Tabela 1). Considerando as bactérias gram-negativas, o género mais frequentemente isolado foi *Pseudomonas* spp. (9.9%), sendo a espécie *Pseudomonas aeruginosa* a mais frequente. Outro género isolado frequentemente foi *Corynebacterium* spp. (Subtil, 2010).

Tabela 1: Microrganismos identificados em canídeos com doença ocular externa (Adaptado de Subtil, 2010).

Bactérias identificadas	Percentagem (n=91)
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,2%
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	13,2%
<i>Streptococcus canis</i>	13,2%
<i>Staphylococcus spp.</i>	8,8%
<i>Streptococcus spp.</i>	6,6%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,6%
<i>Corynebacterium spp.</i>	6,6%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pasteurella spp.</i>	2,2% cada

No Brasil, um estudo similar identificou *S.pseudointermedius* (26,19%), *Bacillus* sp. (20,23%) e *S. aureus* (13,69%) como os agentes mais frequentes em animais com diferentes doenças oftálmicas (Santos et al., 2009). Outro estudo em São Paulo, pelo contrário, verificou uma predominância de agentes gram-negativos como *P.aeruginosa*, seguido por bactérias gram-positivas em cães que já tinham estado em tratamento. Concluíram que as fluoroquinolonas e os aminoglicosídeos deviam ser utilizados como antibióticos de primeira-escolha antes de se obterem os resultados microbiológicos, através de aplicações a cada 1 a 2 horas (Morales, Valinho, Salvadego & Levy, 2009).

Em Pequim, amostras recolhidas a 27 canídeos com úlcera corneal foram analisadas e o género mais frequente foi *Staphylococcus* spp. (47,06%), seguido por *Streptococcus* spp. (12,94%) e *Pseudomonas* spp. (8,24%) (Wang et al., 2008). Resultados obtidos num estudo realizado em Taiwan demonstraram o predomínio de bactérias gram-positivas (78%) e do género *Staphylococcus* spp. (49%), seguido dos géneros *Streptococcus* spp. (7%) e *Corynebacterium* spp. (7%). Das bactérias gram-negativas, as mais frequentes foram *P. aeruginosa* e *Escherichia Coli* (Lin & Petersen-Jones, 2007).

Tolar e o seu grupo (2006) realizaram um estudo nos Estados Unidos da América, no Tennessee e na Florida onde identificaram *S. pseudointermedius* (29%) como a principal bactéria em queratites bacterianas em 97 cães, seguido de *Streptococcus beta-hemolítico* spp. (17%) e *Pseudomonas aeruginosa* (21%).

Segundo Hartmann, Hawley, Werchenthin, Lappin & Hartmann (2010), amostras recolhidas em 41 gatos demonstraram que, de infecções oculares simples ou mistas, *Chlamydia felis* foi identificada em 56% das amostras, *Mycoplasma* em 49%, e o Herpes vírus felino (HVF) em 27%. A bactéria aeróbia mais comum foi do género *Staphylococcus* spp., seguida por *Streptococcus* spp. e *Micrococcus* spp.. Em amostras de gatos com queratite ulcerativa em Taiwan, as bactérias mais predominantes foram as gram-positivas (*Staphylococcus* spp.) e o agente gram-negativo mais vezes isolado foi *P. aeruginosa*. Os antibióticos mais eficazes contra os isolados foram a ciprofloxacina, a tobramicina e a gentamicina (Lin, 2008).

#### **I.2.3.1 *Staphylococcus* spp.**

São bactérias cocos gram-positivas, não móveis, com aproximadamente 1 µm de diâmetro que se juntam em conjuntos semelhantes a cachos de uvas. A maioria é anaeróbia facultativa e catalase positiva. Muitas espécies ocorrem como comensais na pele e membranas mucosas de animais saudáveis, contudo, algumas têm potencial patogénico, pelo que, se houver comprometimento, por exemplo, por trauma, podem causar infecções piogénicas. Vários factores contribuem para a patogenicidade como a produção de coagulase, hemolisina e outras enzimas, exotoxinas, proteína A e factores adesivos (Quin, Markes, Carter, Donnelly & Leonard, 2002). Segundo Subtil (2010), os *Staphylococci* coagulase positivos eram resistentes a moléculas como a amicacina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e ofloxacina mas, segundo Tolar (2006) os estafilococos apresentaram baixa resistência aos antimicrobianos usados no seu estudo.

#### **I.2.3.2 *Streptococcus* spp.**

Estreptococos são cocos gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não móveis e comensais da pele. Muitas espécies são patogénicas e causam infecções piogénicas. Normalmente, estirpes não-hemolíticas e alfa-hemolíticas são encontradas nas mucosas e pele de animais saudáveis, sendo a beta-hemolítica mais patogénica. Foi determinado que o género *Streptococcus* spp. é resistente à estreptomomicina, neomicina e tetraciclina (Subtil, 2010) e que *Streptococcus* beta-hemolítico apresenta resistência à neomicina, polimixina B, tobramicina e cerca de 20% à gentamicina (Tolar et al., 2006).

### **I.2.3.3 *Pseudomonas* spp.**

São bacilos gram-negativos aeróbios obrigatórios, oxidase e catalase positivos e móveis. Distinguem-se dos gram-positivos pela presença de uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos (LPS ou endotoxinas). A porção lipídica (lípidio A) é o componente ativo da endotoxina, presente no interior desta membrana. O polissacarídeo (Antigénio O) dispõe-se à superfície.

As pseudomonas são bactérias ubíquas, podendo ser isoladas da pele, membranas mucosas e, ocasionalmente, do trato gastrointestinal de animais saudáveis. *P. aeruginosa* é o agente patogénico mais importante no género e está associado a queratites severas e progressivas caracterizadas por colagenólise do estroma. Este microrganismo pode também causar blefarites, conjuntivites, dacriocistites, celulite orbital e endoftalmite. É, essencialmente, um agente patogénico oportunista, necessitando que ocorra lesão no epitélio. Os factores patogénicos são as fímbrias que permitem adesão às células epiteliais, a exozima S e o LPS que evitam a fagocitose e ligação do complemento e as proteases, hemolisinas, fosfolipase C e toxinas (exoenzimas S, T, U, Y e exotoxina A) que promovem lesão tecidular (Quin et al., 2002). Embora considerado um agente patogénico extracelular, alguns estudos definiram dois fenótipos: um invasivo que consegue entrar nas células epiteliais da córnea e sobreviver sem destruir as células e um citotóxico com produção de toxinas. Ambos induzem queratites severas, contudo, o primeiro está mais associado à ulceração e corresponde à maioria dos casos isolados no cão, e a segunda a edema corneal. A capacidade de invadir e de se replicar no interior das células, pode proteger estas estirpes do sistema imune e da ação de antimicrobianos como aminoglicosídeos, enquanto continua a estimular a libertação de mediadores da inflamação e da lesão tecidular (Ledbetter, Mun, Kowbel & Fleiszig, 2009). Segundo Ledbetter, Hendricks, Riis, e Scarlett (2007) dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* estudados, todos foram suscetíveis às fluoroquinolonas como a ciprofloxacina ou a levofloxacina. Tolar et al. (2006) verificaram que *P. aeruginosa* foi resistente à bacitracina, cloranfenicol e cefalotina.

### **I.2.4 Vias de administração ocular**

O olho apresenta várias barreiras à proliferação e desenvolvimento de infecções contudo, se ocorrer uma lesão estrutural, estas podem ocorrer. Ao contrário de outros órgãos do organismo, é possível a aplicação direta de fármacos, como antimicrobianos. A sua escolha deve ter em conta quais os microrganismos envolvidos na infecção ocular e deve-se evitar o seu uso em afeções oculares não infecciosas. Como existe um número reduzido de fármacos aprovados para uso em animais, a escolha deve ser racional e, por vezes, o uso *off-label* é necessário (Guiguére, 2006).

Os fármacos utilizados para tratar doenças oculares podem ser administrados localmente via tópica, subconjuntival, retrobulbar ou intraocular ou sistemicamente. A via mais apropriada depende da patofisiologia do processo, que inclui a localização, a gravidade da doença e a presença ou não de barreiras oculares íntegras, do paciente (espécie e comportamento), de factores humanos como a habilidade de administrar os tratamentos com a frequência recomendada e o custo e das propriedades do fármaco (solubilidade e formulações disponíveis) (Moore, 2001; Maddison & Watson, 2002).

#### **I.2.4.1 Aplicação tópica**

Os fármacos são preparados em várias formas para administração ocular. Os fármacos oftálmicos aplicados diretamente na superfície ocular, podem ser soluções, suspensões, pomadas, emulsões ou incorporados num sistema de libertação específico (Moore, 2001) e, são utilizados para tratar alterações das pálpebras, conjuntiva, alterações na película lacrimal, córnea, esclera e úvea anterior (Stanley, 2002).

A aplicação tópica de colírios é a via mais utilizada pela facilidade de administração (Maggs, 2001d). Os colírios são formulados para apresentarem uma tonicidade semelhante à das lágrimas e pH entre 3,5 a 10,5. A sua conservação é influenciada pela temperatura, pH da solução e características do fármaco, sendo que devem ser esterilizadas por autoclavagem ou filtros antibacterianos, ou utilizados agentes conservantes. (Maggs, 2001d)

As pomadas oftálmicas são preparadas assepticamente mas, nem sempre esterilizadas. Estas são mais estáveis do que os colírios, contudo, podem interferir com a cicatrização da córnea, não podendo ser utilizadas quando existe uma lesão penetrante. A desvantagem da sua utilização prende-se com a tendência dos proprietários para medicar em excesso, levando a

uma maior perda do fármaco com o respetivo aumento do custo de tratamento (Maggs, 2001d).

Por via tópica, os fármacos distribuem-se pelo olho por três vias: penetração transcorneal, absorção pelos vasos conjuntivais e drenagem e absorção pelo sistema nasolacrimal (Dowling & Kruth, 2006). Com a sua utilização conseguem-se atingir altas concentrações no local onde se pretende atuar, contudo, a constante produção e drenagem de lágrimas leva a uma perda substancial de fármaco (Stanley, 2002). Cada gota comercial consiste em 50 µL de solução ou suspensão mas, apenas entre 10 e 25 µL são retidos no saco conjuntival depois da drenagem, pelo que a aplicação de mais de uma gota de seguida, não aumenta significativamente a concentração de fármaco. Depois de 5 minutos, apenas 20% do fármaco permanece na superfície ocular, sendo o restante absorvido pela conjuntiva ou removido pelo aparelho lacrimal (Dowling & Kruth, 2006).

De forma a prolongar a permanência do fármaco na superfície ocular é possível aumentar a sua concentração, a frequência de aplicação ou a viscosidade do colírio utilizando suspensões oleosas, emulsões ou lipossomas. As pomadas têm um tempo de contacto maior, necessitando de uma menor frequência de aplicação (Stanley, 2002). Outra forma de aumentar o tempo de contacto dos fármacos consiste na utilização de sistemas de lavagem que permitem facilitar os tratamentos oculares em animais que necessitam de aplicação tópica frequente pois permitem a administração de medicações líquidas a alguma distância do olho, sendo utilizados, essencialmente, em equinos e a aplicação pode ser subpalpebral ou nasolacrimal (Moore, 2001). Outros sistemas incluem a utilização de lentes de contacto terapêuticas (*Therapeutic Soft Contact Lenses* – TSCL) como pensos para proteger a córnea durante a cicatrização ou de películas de colagénio com a mesma função (Maggs, 2001b; Crispin, 2005b).

Pela constituição da córnea, apenas fármacos como o cloranfenicol e fluoroquinolonas podem penetrar na córnea facilmente, visto terem características hidrofílicas e lipofílicas. Contudo, quando existe lesão, ocorre alteração da integridade da córnea e a maioria dos antimicrobianos consegue atingir concentrações eficazes no tecido (Dowling & Kruth, 2006).

#### **I.2.4.2 Aplicação subconjuntival e outras vias**

A administração subconjuntival permite tratar lesões da córnea, esclera, úvea anterior e câmara vítrea, permitindo evitar a barreira epitelial corneal (Stanley, 2002). Esta via é utilizada em animais difíceis de tratar e quando se quer uma concentração inicial elevada

(efeito b6lus) sendo, normalmente, utilizada em conjunto com outras vias (Moore, 2001). Os f6rmacos atuam por absor76o da c6rnea ou conjuntiva, por alcan7arem a circula76o ciliar e por sa6da do local de inje76o. A concentra76o antimicrobiana 6 mantida entre 3 a 6 horas e depois diminui ao longo das 24 horas seguintes. Podem ocorrer algumas complica76es decorrentes de inje76es repetidas como a irrita76o da conjuntiva, forma76o de granuloma, inje76o intraocular ou intraescleral por equ6voco (Dowling & Kruth, 2006), e existe a possibilidade de absor76o pela corrente sang6nea levando a efeitos sist6micos (Moore, 2001).

Outras vias de administra76o de f6rmacos consistem: na inje76o retrobulbar utilizada apenas para tratamento de processos na 6rbita ou parte posterior do globo ocular (Maggs, 2001d), intrav6treo para tratamento de endoftalmite infecciosas, provocar a abla76o do epit6lio ciliar em casos de glaucoma cr6nico e para liberta76o de subst6ncias que tamponem a retina no caso de descolamento e a via sist6mica utilizada em infe76es intraoculares ou periorbitais. A via sist6mica 6 a preferencial para tratar os segmentos posteriores do olho (Moore, 2001). A Tabela 2 lista as vias sugeridas para administra76o em cada constituinte do olho.

Tabela 2: Vias sugeridas para administra76o no olho (Adaptado de Stanley, 2002)

	<b>Administra76o t6pica</b>	<b>Administra76o Subconjuntival</b>	<b>Administra76o Sist6mica</b>
P6lpebras	+		+
Conjuntiva	++	+	Doxiciclina em gatos
C6rnea	++	+	
Esclera	+	+	+
Iris, corpo ciliar	+	+	++
V6treo		+	+
Retina			+
Nervo 6tico			+
6rbita/ Retrobulbar			+

### **1.2.5 F6rmacos antimicrobianos**

O objetivo da terap6utica com agentes antimicrobianos 6 ajudar seletivamente o corpo a eliminar os organismos infecciosos sem, contudo, apresentar toxicidade para o indiv6duo. Existem diferentes factores que podem diminuir o sucesso da terap6utica. Entre estes, encontram-se os relacionados com o agente (sensibilidade bacteriana), o local de a76o, (como a distribui76o para o local da infe76o em concentra76o adequada e condi76es ambientais favor6veis) e a ades6o do cliente (administra76o correta da dose e respeito pelos intervalos corretos) (Maddison & Watson, 2002).



A seleção do antibiótico deve, assim, ter em conta a suscetibilidade do agente patogénico, a obtenção de concentrações efetivas no local de infeção, não ser tóxico, requerer um stress mínimo ao animal e não ser caro. Deve-se considerar que os agentes antimicrobianos podem ter efeitos adversos, como a toxicidade direta no indivíduo, reações de hipersensibilidade, interações adversas com outros fármacos, interferência com a flora normal, necrose dos tecidos nos locais de injeção, enfraquecimento dos mecanismos de defesa ou imunes, lesão de tecidos fetais ou neonatais e seleção ou promoção de resistência antimicrobiana. A toxicidade direta é limitativa da sua utilização. Alguns agentes são considerados seguros, enquanto outros como os aminoglicosídeos são potencialmente tóxicos. A toxicidade pode, contudo, ser minimizada pelo alargamento do intervalo de administração, utilização de doses mínimas efetivas ou combinação com outros agentes que permitam aumentar a eficácia contra agentes patogénicos, sem aumentarem a sua toxicidade (Walker & Guiguère, 2006).

Os fármacos antimicrobianos são, frequentemente, utilizados para tratar doenças oftálmicas, sendo que a seleção neste caso vai depender das formulações disponíveis (solução, suspensão, pomada) (Moore, 2001). Os agentes antibacterianos (Tabela 3) são usados para tratar conjuntivites bacterianas, queratites, uveítes anteriores e, profilaticamente, em casos de queratite ulcerativa (Gould, 2002).

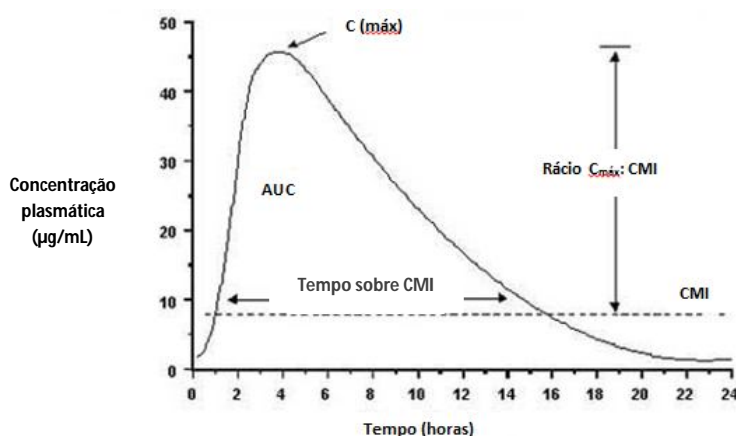
Tabela 3: Fármacos antibacterianos para uso tópico no olho (Adaptado de Gould, 2002)

Fármaco	Espectro de ação	Indicações
Ácido Fusídico	Amplo, mas ineficaz contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infeções superficiais por bactérias gram-positivas
Cloranfenicol	Amplo, contudo <i>Pseudomonas</i> spp. pode ser resistente. Eficaz contra anaeróbios.	Infeções superficiais, intra-oculares e como profilático após cirurgia
Gentamicina	Amplo, mas os estreptococos são usualmente resistentes	Infeções superficiais por gram-negativas como <i>P.aeruginosa</i>
Ciprofloxacina	Amplo, mas alguns estafilococos e estreptococos são resistentes	Infeções de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a gentamicina
Tetraciclina	Amplo, contudo a resistência é comum	Conjuntivite felina por clamídia
Neomicina	Amplo	
Polimixina B	Bactérias gram-negativas, como <i>Pseudomonas</i> spp.	Infeções superficiais mistas
Bacitracina	Bactérias gram-positiva como estreptococos	

Os antibióticos podem ser divididos em duas categorias de acordo com a sua farmacodinâmica. São factores importantes: a concentração mínima inibitória (CMI) correspondendo à menor concentração de um antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de determinado microrganismo, a concentração máxima (C<sub>máx</sub>) e a área sob a curva de concentração / tempo no plasma (AUC). Podem ser antibióticos tempo-dependentes, como os  $\beta$ -lactâmicos, que exercem o seu efeito bactericida quando são mantidos em concentrações

superiores à CMI durante um determinado período de tempo, ou concentração-dependentes como aminoglicosídeos, ou fluoroquinolonas, sendo que a eliminação dos microrganismos é maior com o aumento da concentração acima da CMI, sendo o rácio entre a  $C_{m\acute{a}x}$  e a CMI importante para avaliar a sua eficácia. Alguns fármacos apresentam características tempo e concentração dependentes onde se utiliza o rácio AUC e CMI para prever a sua eficácia (Guiguère, 2006). A eficácia de um antibiótico depende da manutenção da sua concentração acima da CMI durante o tempo necessário para eliminar a infeção. As frequências de administração altas de alguns fármacos aliadas à não cooperação pelos proprietários dos animais originam concentrações séricas abaixo da CMI, o que pode induzir à formação de resistências (Gao, Nie, Zou, Shi & Cheng, 2011).

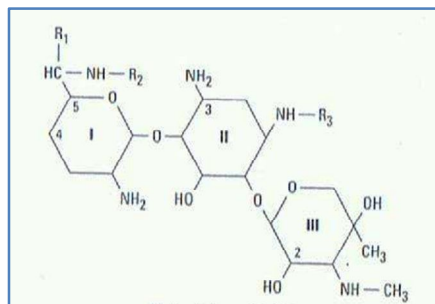
Gráfico 1: Representação da concentração plasmática de fármacos após administração ao longo do tempo e factores a ter em conta na avaliação da eficácia. (Adaptado de Papich, M.G.)



### I.2.5.1 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas, utilizados para tratar infeções sérias causadas por bactérias gram-negativas e estafilococos. A maioria é natural sendo produzidos por *Streptomyces* spp., *Micromonospora* spp., e *Bacillus* spp. São formados por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligações glicosídicas a uma hexose aminada (núcleo aminociclitol), chamando-se também de aminoglicosídeos aminociclitóis (Figura 2) (Montero & Brandão, 2006). Apresentam boa solubilidade em meios aquosos, mas baixa em lípidos e são termodinamicamente estáveis em intervalos grandes de pH e temperatura. O peso molecular é cerca de 400 a 500 g/mol. Possuem um grande número de grupos amino-acídicos, o que os torna em poliacatiões básicos com pKa entre 7,2-8,8, mostrando-se ionizados a pH fisiológico (Dowling, 2006).

Figura 2: Estrutura química da gentamicina (Adaptado de Chambers, 2004a)



Os aminoglicosídeos são bactericidas e a sua atividade depende da concentração. Apresentam um efeito pós-antibiótico de supressão do crescimento bacteriano após as concentrações descenderem abaixo do CMI. O mecanismo de penetração nas bactérias consiste na difusão a partir da membrana externa da parede das gram-negativas, por canais formados por proteínas (porinas), seguido de transporte ativo dependente de oxigênio para o citoplasma, onde ocorre interação com os ribossomas (Riviere & Spoo, 2001). Estes fármacos são, desta forma, inativos contra anaeróbios e anaeróbios facultativos (Dowling, 2006; Montero & Brandão, 2006). O seu mecanismo de ação é baseado na ligação irreversível à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, interferindo com vários mecanismos de transcrição de ARNm e inibindo a síntese de proteínas. Outros efeitos incluem, a interferência com o sistema de transporte de eletrões, a indução da quebra de ARN e a alteração do metabolismo do ADN (Riviere & Spoo, 2001; Dowling, 2006). A sua ação é diminuída pela presença de catiões divalentes ou detritos e, geralmente, aumentada com a elevação do pH (Riviere & Spoo, 2001).

São ativos, predominantemente, contra bactérias gram-negativas aeróbias (*E.Coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *P. aeruginosa*). A sensibilidade das bactérias gram-positivas é, de um modo geral, baixa para os aminoglicosídeos, sendo *Staphylococcus* spp. normalmente suscetíveis e alguns *Mycobacterium* e *Mycoplasma* suscetíveis (Montero & Brandão, 2006). A Gentamicina numa concentração entre 0,5-5,0 ug/mL apresenta efeito bactericida contra microrganismos gram-positivos e gram-negativos, apresentando uma CMI<sub>90</sub> de 1 µg/mL no caso de *S. aureus*, CMI<sub>90</sub> de 2 µg/mL para *E. Coli* e CMI<sub>90</sub> de 8 µg/mL para *P. aeruginosa* (Dowling, 2006).

A Tabela 4 resume as CMI<sub>90</sub> da Gentamicina para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e Enterobactérias.

Tabela 4: CMI<sub>90</sub> da Gentamicina em mg/L (Adaptado de Sueke et al., 2010).

	<b>Gentamicina</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,000
Enterobactérias	1,000

Os aminoglicosídeos não atravessam as membranas lipídicas do olho intacto, mas quando há lesão da córnea atravessam o estroma, sendo úteis em infecções oculares de superfície que causam ou complicam uma conjuntivite ou queratite ulcerativa. (Riviere & Spoo, 2001; Maddison & Watson, 2002). A gentamicina tópica é recomendada como terapêutica inicial em infecções por gram-negativas, sendo muito eficaz contra *P. aeruginosa* (Gould, 2002) e *Staphylococcus* spp., contudo, devido à ocorrência de resistências deve ser restrita a infecções severas com ulceração da córnea (Riviere & Spoo, 2001; Maddison & Watson, 2002).

### **I.2.5.2 Fluoroquinolonas**

As fluoroquinolonas são agentes antibacterianos sintéticos, bactericidas contra uma grande variedade de bactérias, bem toleradas e podem ser administradas por diferentes vias (Papich & Riviere, 2001). A primeira a ser aprovada para uso em animais foi a enrofloxacin, seguindo-se outras como a difloxacin, a orbifloxacin, a marbofloxacin, a danofloxacin, a ibafloxacin e a pradofloxacin (Walker & Kruth, 2006).

A estrutura química base das quinolonas consiste num anel 4-quinolona; a adição de um átomo de flúor na posição 6 do núcleo quinolónico originou uma nova molécula denominada de fluorquinolona, alargando-se o espectro de ação contra gram-positivos e gram-negativos e aumentando a potência (Figura 3). A modificação da molécula com a adição de grupos específicos permitiu melhorar o espectro de atividade para incluir as pseudomonas e outras bactérias gram-negativas, diminuir alguns efeitos adversos sob o sistema nervoso central e aumentar a atividade contra os estafilococos. São agentes bactericidas por inibirem a transcrição e a replicação de ADN bacteriano, através do bloqueio funcional da ADN girase, uma topoisomerase II formada por duas subunidades (A e B) que é necessária para que ocorra o desenrolamento do ADN e a sua transcrição. O principal local de ação, principalmente, em bactérias gram-negativas, é a subunidade A. Outra enzima inibida é a topoisomerase IV,

importante em bactérias gram-positivas como estreptococos e estafilococos (Maddison & Watson, 2002). Os mamíferos alvos de terapêutica são resistentes porque a Topoisomerase II nas células não é inibida até concentrações entre 100-1000 µg/mL, enquanto as bactérias são inibidas a concentrações 0,1-10 µg/mL (Papich & Riviere, 2001).

Figura 3: Estrutura química da levofloxacin (Adaptado de Chambers, 2004c)



As fluoroquinolonas são moléculas lipossolúveis e anfotéricas que podem ser protonadas nas extremidades carboxilo e amina da molécula. O valor de pKa varia, mas geralmente o pKa do carboxilo é 6,0-6,5 e o pKa para azoto do grupo piperazina é 7,5-8. O ponto isoelétrico que é o valor equidistante aos dois pKa, é o ponto onde a molécula é mais lipofílica. Num pH fisiológico, as fluoroquinolonas existem como zwitteriões, ou seja, apresentam cargas positivas e negativas (catião e anião) ao mesmo tempo (Papich & Riviere, 2001). Consideram-se como fármacos concentração dependentes e podem apresentar um efeito pós-antibiótico *in vivo* prolongado para algumas bactérias. O potencial para um rápido desenvolvimento de resistências é uma desvantagem e deve ser minimizado com a prescrição de doses apropriadas (Walker & Kruth, 2006).

Têm excelente atividade *in vitro* contra uma grande variedade de bactérias gram-negativas aeróbias, incluindo enterobactérias: *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Histophilus somni*, *Manheimia haemolytica* e *Pasteurella* spp., incluindo *P. multocida*. (Walker & Kruth, 2006) A *Pseudomonas aeruginosa* tem uma suscetibilidade variável, tendo uma concentração mínima inibitória (CMI) maior do que as outras bactérias (Walker & Kruth, 2006; Guimarães, 2006). As bactérias gram-positivas também apresentam uma suscetibilidade variável, sendo as espécies *S. aureus* e *S. intermedius*, normalmente, susceptíveis. As estirpes de estafilococos resistentes à meticilina também o podem ser frente às fluorquinolonas (Papich & Riviere, 2001).

A geração mais recente que mostrou uma atividade aumentada para cocos gram- positivos e bactérias anaeróbicas, inclui a levofloxacin, a moxifloxacin, a gatifloxacin e a premafloxacin (Papich & Riviere, 2001). A levofloxacin (derivado químico da ofloxacin) apresenta uma atividade semelhante à ciprofloxacin, contudo esta é mais eficaz contra a *P.*

*aeruginosa*. Entre os estafilococos, a maior parte dos *S. aureus* meticilino-resistentes são sensíveis à levofloxacina (CMI<sub>90</sub>, 0,5-1 µg/mL), contudo, a eficácia contra enterococos é baixa (CMI<sub>90</sub> 3,1 µg/mL) (Guimarães, 2006).

A Tabela 5 resume as CMI<sub>90</sub> da levofloxacina, ofloxacina e ciprofloxacina segundo um estudo realizado por Sueke et al. (2010).

Tabela 5: CMI<sub>90</sub> para levofloxacina, ofloxacina e ciprofloxacina em mg/L (Adaptado de Sueke et al., 2010).

	Levofloxacina	Ofloxacina	Ciprofloxacina
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,380	2,700	3,000
<i>Streptococcus spp.</i>	1,500	4	3,000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,525	1,500	0,500
Enterobactérias	0,190	0,380	0,125

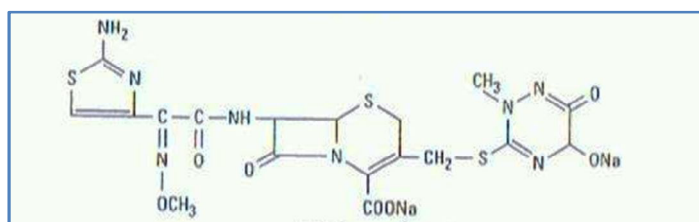
Alguns factores que podem afetar a atividade no local de infeção incluem a presença de catiões de alumínio, magnésio, ferro e cálcio, que se podem ligar ao grupo carboxilo diminuindo a sua eficácia e, o pH baixo que pode levar a um aumento da CMI (Papich & Riviere, 2001).

No caso das úlceras corneais progressivas não responsivas ao tratamento inicial, podem ser utilizadas formulações destinadas a humanos como as fluoroquinolonas, eficazes contra o género *Pseudomonas spp.* resistente aos aminoglicosídeos e estafilococos produtores de beta-lactamases (Walker & Kruth, 2006).

### I.2.5.3 Cefalosporinas

A primeira cefalosporina descoberta foi a cefalosporina C, um produto de *Cephalosporium acremonium* (Vaden & Riviere, 2001). Por hidrólise ácida, obteve-se o ácido 7-amino-cefalosporânico, núcleo a partir do qual por adição de cadeias laterais se obtêm as diferentes cefalosporinas, com diferentes atividades antimicrobianas, estabilidades contra beta-lactamases, ligação às proteínas, metabolismo e toxicidade (Guimarães, 2006). Apresentam peso molecular (PM) entre 400 e 450, são solúveis em água e relativamente estáveis a alterações de pH e de temperatura (Chambers, 2004b). A Figura 4 mostra a estrutura química da ceftriaxona.

Figura 4: Estrutura química da ceftriaxona. (Adaptado de Chambers, 2004b)



São antibióticos beta-lactâmicos, exercendo o seu efeito ao inibir o terceiro e último passo da síntese da parede bacteriana, alterando a sua integridade. Para atuarem nas bactérias gram-negativas é necessário que tenham capacidade para atravessarem a membrana bacteriana externa, estabilidade contra beta-lactamases localizadas no periplasma e afinidade para as enzimas-alvo localizadas na membrana interna (Guimarães, 2006). São substâncias bactericidas, relativamente não tóxicas e podem ser utilizadas em indivíduos sensíveis à penicilina. Apresentam efeito pós-antibiótico contra cocos gram-positivos (Prescott, 2006).

A ceftriaxona é uma cefalosporina de terceira geração. Estas apresentam um largo espectro de ação e são resistentes às beta-lactamases. Em relação às gerações anteriores, exibem menor atividade contra bactérias gram-positivas mas maior atividade contra gram-negativas. Demonstram boa atividade contra a maioria das enterobactérias, sendo *E.Coli*, *Salmonella*, *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp. suscetíveis (CMI inferior ou igual a 2 µg/mL). Algumas bactérias como *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *S. aureus* e algumas *P. aeruginosa* são moderadamente suscetíveis (CMI 4 µg/mL), sendo resistentes com CMI superior ou igual a 8 µg/mL outras *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus* meticilina-resistentes. Os *Streptococcus* spp. são muito suscetíveis e os *Staphylococcus* spp. moderadamente suscetíveis (Prescott, 2006).

As cefalosporinas podem ser utilizadas em infecções graves causadas por bactérias gram-positivas como *Streptococcus* spp. ou após TSA (Vaden & Riviere, 2001). Embora não sejam aprovadas para aplicação direta no olho, as cefalosporinas de segunda geração como a cefoxitina, com espectro de ação contra gram-positivos, é utilizada em associação com, por exemplo, a ofloxacina ou a gentamicina (Glaze, 2012).

### I.3 Biomateriais

Um biomaterial é “uma substância que foi desenhada para, de forma isolada ou como parte de um sistema mais complexo e, por controlo das interações com componentes de sistemas vivos, direcionar o curso de um procedimento terapêutico ou de diagnóstico” (William, 2013, tradução livre) e pode ser aplicado em várias áreas, nomeadamente, em medicina. Um dos biomateriais que tem recebido uma grande atenção é o quitosano.

### I.4 Quitosano

O quitosano é obtido a partir da quitina por uma reação de desacetilação em meio alcalino (Laranjeira & Fávere, 2009). Segundo Roberts (citado por Aranaz, et al. 2009),<sup>1</sup> a quitina é o segundo biopolímero natural mais abundante a seguir à celulose e é encontrada na estrutura de um grande número de invertebrados, fazendo parte do exosqueleto de crustáceos, da cutícula de insectos e da parede celular de fungos. É um polissacarídeo composto por unidades de glucose, sendo estruturalmente semelhante à celulose, exceto na substituição de um grupo hidroxilo por um grupo acetamida na posição C-2 (Senel & McClure, 2004; Kurita, 2006). Muzzarelli (citado por Laranjeira & Fávere 2009)<sup>2</sup> refere que este polímero possui uma estrutura cristalina organizada, apresenta baixa reatividade química, é insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, sendo este o maior fator limitante da sua utilização.

Roberts (citado por Aranaz, et al. 2009) escreve que o quitosano só ocorre naturalmente em alguns fungos como é exemplo a família *Mucoraceae*.

#### I.4.1 Estrutura química

A quitina e o quitosano são descritos por Aiba (citado por Aranaz et al., 2009)<sup>3</sup> como uma família de polissacarídeos lineares constituídos por diferentes quantidades de unidades  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (resíduos de N-acetil glucosamina) e  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) 2-amino-2-desoxi-D-glucose (resíduos de D-glucosamina), que se repetem e que estão unidas por ligações glicosídicas (Figura 5). A quantidade de resíduos de D-glucosamina determina a solubilidade em meios aquosos ácidos. A quitina ao possuir menor quantidade destas unidades é insolúvel nestes meios, ao contrário do quitosano.

---

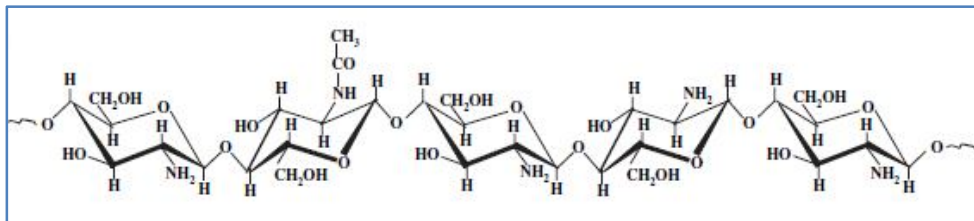
<sup>1</sup> Roberts, G. (1998). *Chitin Chemistry*. London: Macmillan

<sup>2</sup> Muzzarelli, R.A.A. (1973). *Natural chelating polymers*. (pp.1-254) Oxford: Pergamon.

<sup>3</sup> Aiba, S. (1992). Lysozyme hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14, 225-228.



Figura 5: Estrutura primária do quitosano (Adaptado de Prashanth & Tharanathan, 2007).



O quitosano pode ser preparado por clivagem dos grupos N-acetil, das unidades N-acetil glucosamina da quitina. Contudo, como a reação é normalmente incompleta é descrito como uma estrutura copolimérica de resíduos D-glucosamina com resíduos N-acetil. A fração molar dos grupos de N-acetil glucosamina é expressa como o grau de N-acetilação ou fração de acetilação e a fração molar de resíduos de D-glucosamina como grau de desacetilação (Aranaz et al., 2009). A massa molar da quitina é geralmente maior do que  $10^6$  Daltons (Da), enquanto a do quitosano encontra-se entre  $1,0 \times 10^5$  e  $1,2 \times 10^6$  Da (Laranjeira & Fávere, 2009). Um quitosano com  $10^6$  Da é considerado de alto peso molecular, formando soluções com alta viscosidade (Zhang et al., 2010).

Este polímero é formado por três tipos de grupos funcionais reativos, um grupo amino/acetamido e grupos hidroxilo primário e secundário nas posições C-2, C-3 e C-6, respetivamente. O conteúdo em aminas é o fator que mais contribui para conferir diferentes estruturas e propriedades físico-químicas e sendo a sua distribuição aleatória, facilmente se criam ligações de hidrogénio (Zhang et al., 2010).

Apresenta-se em diferentes formas que variam no peso molecular e no grau de desacetilação (Kean & Thanou, 2010). O grau de desacetilação, a massa molar e o conteúdo de impurezas dependem da fonte natural de matéria-prima e dos métodos de preparação (Laranjeira & Fávere, 2009).

#### I.4.2 Métodos de preparação

O processo de obtenção do quitosano envolve diferentes fases que incluem a extração e desacetilação da quitina e a despolimerização do quitosano. Embora presente em numerosos grupos taxonómicos, a quitina comercial é, normalmente, obtida de crustáceos marinhos, principalmente, pela grande quantidade de desperdícios disponíveis decorrentes da indústria processadora de marisco. O exosqueleto dos crustáceos tendo em conta a variabilidade entre

espécies e a estação do ano consiste em: proteína, carbonato de cálcio, quitina e em pigmentos de natureza lipídica como os carotenóides (Aranaz et al., 2009).

A extração da quitina ocorre por um processo de desmineralização utilizando uma solução de ácido clorídrico (HCl) que permite dissolver o carbonato de cálcio, seguido da utilização de um agente alcalino como o hidróxido de sódio (NaOH) para dissolver as proteínas até à obtenção de um produto sem cor e remoção de impurezas (Al-Sagheer, Al-Sughayer, Muslim & Elsabee, 2009). O facto de a desmineralização ocorrer antes da desproteínização permite formar uma quitina compacta em que a cadeia original e estrutura se mantêm (Aranaz et al., 2009). A segunda fase consiste na desacetilação da quitina por hidrólise de grupos acetamida da quitina através de tratamentos alcalinos com hidróxido de sódio a elevadas temperaturas (Al-Sagheer et al., 2009) ou utilizando uma enzima como a desacetilase de quitina (Rinaudo, 2006). A desacetilação pode ser heterogénea, sendo utilizada sobre quitina no estado sólido, ou homogénea utilizada sobre quitina pré-hidratada sob vácuo. Por último pode-se proceder à despolimerização do quitosano. Embora este seja insolúvel a pH superior a 6,3 (pKa), os seus oligómeros são solúveis a pH neutro e apresentam baixa viscosidade. A produção de quitosano de baixo peso molecular e quitoooligossacarídeos pode ser alcançada por hidrólise da cadeia (Zhang et al., 2010). Este processo pode ocorrer quimicamente, por hidrólise com ácidos (HCl) ou por uma reação oxidativa com ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) ou peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), por reação enzimática com a utilização de quitinases, quitosanase, gluconase e algumas proteases (Prashanth & Tharanathan, 2007) ou fisicamente por radiação (Choi, Ahn, Lee, Byun & Park, 2002). O método de preparação pode alterar as características do produto final.

### **I.4.3 Características do quitosano**

#### **I.4.3.1 Características físico-químicas**

Este biopolímero pode facilmente dissolver-se em soluções de ácidos fracos devido à protonação dos grupos amino, presentes ao longo da sua cadeia. Esta reação permite conferir uma carga positiva (Rinaudo, 2006; Zhang et al., 2010). A utilização de ácidos orgânicos e inorgânicos, como o glutâmico, hidrolórico, láctico e acético permite a formação de sais solúveis em água (Senel & McClure, 2004), sendo o último, o solvente mais utilizado (Laranjeira & Fávere, 2009).

Quando o quitosano possui um alto grau de desacetilação, cerca de 85%, torna-se facilmente solúvel em soluções ácidas com pH inferior a 6,5 (Rodrigues, Dionísio, López & Grenha, 2012) sendo a solubilização mais difícil, quanto menor o grau de desacetilação (Cho, Jang, Park & Ko, 2000).

A presença dos grupos amino reativos distribuídos pela matriz permite a ocorrência de várias modificações químicas, como por exemplo, a formação de complexos poli eletrolíticos ou com metais pesados (Rinaudo, 2006). Estas modificações podem alterar as características físicas, como a solubilidade e capacidade de absorção de água, a sua funcionalidade, como a capacidade de bioadesão ou as propriedades biológicas do quitosano (Senel & McCure, 2004; Zhang et al., 2010).

Uma das vantagens do quitosano é a capacidade de ser modificado fisicamente, podendo ser utilizado como pó, flocos, microesferas, nanopartículas ou membranas (Laranjeira & Fávere, 2009). O alto potencial para hidratação, as propriedades físicas e químicas e o comportamento poli eletrolítico aliados ao facto de ser considerado não tóxico, biocompatível e biodegradável, permitem a sua utilização como biomaterial em áreas farmacêuticas e médicas como veículo de libertação de fármacos ou pensos para cicatrização de feridas (Aranaz et al., 2009; Rodrigues et al., 2012).

#### **I.4.3.2 Biodegradabilidade**

Biodegradabilidade consiste na capacidade de um material ser degradado em produtos inócuos pela ação de organismos vivos (Merriam- Webster's online dictionary, 2013). Esta característica é fundamental em termos de toxicidade aguda ou crónica, pois materiais não degradáveis podem acumular-se nos órgãos ou no interior da célula (Baldrick, 2010).

Embora a quitina e o quitosano não existam nos mamíferos, podem ser degradados *in vivo* por várias proteases, como a lisozima e a pepsina. Nesta reação ocorre a hidrólise dos resíduos acetilados, o que origina a formação de oligossacarídeos não tóxicos de diferentes comprimentos e que podem ser incorporados por glicosaminoglicanos e glicoproteínas entrando, posteriormente, em vias metabólicas (Senel & McClure, 2004) ou sendo, excretados pela urina (Baldrick, 2010).

O grau de degradação está inversamente relacionado com o grau de cristalinidade, sendo este controlado pelo grau de desacetilação. Assim, um grau de desacetilação elevado permite taxas

de degradação mais lentas, podendo este polímero permanecer *in vivo* vários meses (Senel & McClure, 2004; Aranaz et al., 2009). Outro fator que influencia o grau de degradação é a variação na distribuição de grupos acetamida na molécula de quitosano (Shigemasa, Saito, Sashiwa, Saimoto, 1994; Aranaz et al., 2009).

A taxa de degradação afeta a biocompatibilidade, pois uma taxa muito elevada com rápida degradação do quitosano, produz a acumulação de açúcares amino e uma resposta inflamatória mais acentuada (Rodrigues et al., 2012).

#### **I.4.3.3 Biocompatibilidade**

Biocompatibilidade corresponde à “capacidade de um biomaterial realizar a sua função em termos de terapêutica médica, sem induzir uma resposta local ou sistémica no indivíduo usufruidor dessa terapia, originando uma resposta celular ou tecidual mais benéfica e otimizando o desempenho clinicamente relevante da terapia” (Williams, 2008, tradução livre). Consiste no uso de um material inofensivo para o indivíduo por ser inerte biológica e/ou quimicamente por integração com sucesso com proteínas e células, dependendo da via de administração, frequência e dose administrada. A biocompatibilidade deve assim ser avaliada para cada caso e condição particular requerendo testes específicos (Rodrigues et al., 2012).

A utilização do quitosano como transportador em sistemas de libertação de fármacos tem implicações na biocompatibilidade, pois o facto de apresentar cargas positivas permite a interação com a membrana das células que possui um potencial de membrana negativo (aproximadamente -70mV) devido a trocas iónicas entre o meio intracelular e extracelular mediado pelas bombas de sódio e de potássio (Heidemann, 1997) podendo, no caso de nanopartículas de quitosano, ocorrer a sua internalização pelas células (Sahay, Aćakhova, & Kabanov, 2010). Quando é utilizado como transportador ocorre interação com outra substância, o que pode reduzir o número de cargas amino-acídicas disponíveis e diminuir a interação com as células e potencial toxicidade. Outras características do quitosano também influenciam o seu comportamento químico, sendo que um grau de desacetilação alto permite uma maior interação e internalização pelas células (Huang, Khor, & Lim, 2004). Dependendo da dose e das características do material, as soluções de quitosano podem apresentar um certo grau de toxicidade. Foi observado que quando é utilizado como material de matriz não existe toxicidade evidente em concentrações de cerca 1 mg/mL (Rodrigues et al., 2012).

A avaliação da biocompatibilidade depende da natureza e do tempo de contacto do sistema de libertação com o organismo, sendo estes avaliados por testes de citotoxicidade, sensibilização e irritação ou reatividade intracutânea. Nestes testes deve ser avaliada a morfologia e a integridade da membrana celular, eficiência do metabolismo e testes genotóxicos (Rodrigues et al., 2012). Deve-se considerar que a presença de resíduos de proteínas pode causar reações alérgicas, dependendo esta da origem e método de preparação.

#### **I.4.3.4 Mucoadesão**

Bioadesão corresponde à manutenção de um material em contacto com outro de natureza biológica, como um epitélio ou muco por um determinado período de tempo (Achouri, Alhanout, Piccerelle & Andrieu, 2012). O muco é composto por glicoproteínas (mucinas), carregadas negativamente devido à presença de resíduos do ácido siálico (Aranaz et al., 2009). Devido à sua carga positiva, o quitosano adere à superfície da mucosa, favorecendo a interação de fármacos com a camada de muco que cobre diferentes superfícies. Esta propriedade permite aumentar a retenção de substâncias no local e consequente absorção (Rodrigues et al., 2012.). Ao ser utilizado um material com propriedades mucoadesivas como transportador, a taxa de eliminação do fármaco é controlada pela renovação da camada de muco (Sánchez, 2003). Quando o grau de desacetilação aumenta, existem mais grupos amina com carga positiva disponíveis para interação com o ácido siálico (Rodrigues et al., 2012).

#### **I.4.3.5 Aumento da permeabilidade a fármacos**

Foi verificado que o quitosano pode auxiliar no aumento da permeabilidade, ao abrir temporariamente de forma reversível as junções epiteliais, permitindo a passagem de macromoléculas pela barreira epitelial (Rodrigues et al., 2012). O mecanismo pode dever-se à interação da carga positiva do mesmo com a membrana celular, resultando numa reorganização das proteínas associadas a estas estruturas (Smith, Wood & Dornish, 2004).

#### **I.4.4 Aplicações do quitosano**

Devido às suas características, o quitosano apresenta numerosas aplicações em diferentes campos como os da: nutrição, biomedicina, biotecnologia, agricultura, veterinária e proteção ambiental (Laranjeira & Fávere, 2009). Contudo, as diferentes estruturas do quitosano apresentam diferentes atividades biológicas e nem todas as atividades biológicas são encontradas num único quitosano (Zhang et al., 2010).

##### **I.4.4.1 Cicatrização de feridas**

O quitosano favorece a migração e proliferação dos fibroblastos e das células endoteliais vasculares e promove as funções de células inflamatórias como os PMN (fagocitose, produção de osteopontina e leucotrieno B<sub>4</sub>), macrófagos (fagocitose, produção de interleucina-1 e factores de crescimento) e fibroblastos (produção IL-8), contribuindo na organização e formação de tecido de granulação com angiogénese, o que acelera a cicatrização de feridas (Ueno, Mori, & Fujinaga, 2001). Os oligómeros de quitosano também demonstraram esta característica cicatrizante ao estimular a produção de fibroblastos, sendo que a deposição seguinte do colagénio proporciona a formação do tecido conjuntivo (Okamoto et al., 2002a). Verificaram ainda que a força de cicatrização<sup>4</sup> aumentava com o grau de desacetilação (Minagawa, Okamura, Shigemasa, Minami, & Okamoto, 2007). Num estudo foi avaliada a capacidade cicatrizante das fibras de quitosano sobre feridas induzidas por radiação que apresentavam lesões nas células endoteliais e nos fibroblastos levando a um atraso na cicatrização, em cães. Os resultados concluíram que ocorria a formação de capilares e de tecido de granulação nestas lesões (Ueno et al., 2007).

Na preparação e avaliação de filmes compostos por quitosano e diferentes concentrações de gelatina e etilenoglicol por Hima Bindu, Vidyayathi, Kavitha, Sastry & Suresh Kumar (2010), estes verificaram que esta combinação aumentava a velocidade de cicatrização em roedores. Na avaliação da capacidade antibacteriana, a zona de inibição do disco com melhor taxa de difusão contendo quitosano e gelatina foi inferior ao que apenas continha quitosano. Li et al. (2012) estudaram um hidrogel com constituição de um derivado do quitosano (N,O-carboximetil quitosano) e alginato oxidado para aplicação em feridas na pele e libertação de curcumina, verificando que favorecia a reepitelização da epiderme e deposição de colagénio.

---

<sup>4</sup> Tradução livre de *wound break strength*

#### **I.4.4.2 Hemostático**

Alguns estudos demonstraram que o quitosano apresenta características hemostáticas. Okamoto, et al (2003) estudaram os efeitos de uma suspensão de quitosano (com PM de 80 KD e GD superior a 80%) em sangue canino e, verificaram uma diminuição significativa do tempo de coagulação dependendo da dose e, que promovia a libertação de um fator de crescimento derivado das plaquetas. Num estudo em que se comparavam esponjas de colagénio e quitosano, ambas diminuíram o tempo de coagulação contudo, observaram que as segundas aderiam mais à superfície dos músculos de coelhos, enquanto as de colagénio eram facilmente removidas (Wang et al, 2006).

Estudos mostraram que a ação do quitosano é independente da via clássica da coagulação, não ativando factores de coagulação, nem originando a ativação da via intrínseca (Baldrick, 2010). Os efeitos estarão relacionados com a agregação de plaquetas e glóbulos vermelhos (Zhang et al., 2010). Considerando que os glóbulos vermelhos apresentam uma membrana com carga negativa o contacto com o quitosano é favorecido (Aranaz et al., 2009).

Em medicina veterinária é possível utilizar pensos hemostáticos em hemorragias agudas que possuem quitosano na sua composição. Estes permitem controlar a hemorragia formando um coágulo e uma barreira antibacteriana. São facilmente removíveis com soro fisiológico ou água (White, 2008). Szátmari (2012) apresentou um estudo experimental com cães, onde avaliou a eficácia de pensos de quitosano comercializados (HemCon®, HemCon Medical Technologies Europe, Ltd., Irlanda) no controlo de hemorragia após punção da artéria femoral com *introducer-sheaths*. Os pensos foram aplicados e foi exercida pressão manual durante dez minutos. Verificou-se que estes pensos permitiam controlar a hemorragia caso os *introducer-sheath* tivessem um diâmetro inferior ao do lúmen da artéria.

#### **I.4.4.3 Antimicrobiano**

Alguns estudos têm demonstrado que o quitosano poder ter alguma atividade antimicrobiana contudo, não se conhece o mecanismo pelo qual este fenómeno acontece. Um dos mecanismos propostos, consiste na interação com grupos aniónicos da superfície de bactérias gram-negativas originando uma camada impermeável em redor da célula, o que impede o transporte de solutos essenciais (Aranaz et al., 2009). Helander e o seu grupo (2001) estudaram o modo da ação do quitosano (GD superior a 83%) na membrana externa de bactérias, em condições ligeiramente ácidas e verificaram alterações na superfície celular.

Outro mecanismo descrito corresponde à inibição de transcrição do ADN e da síntese proteica ao entrar no núcleo das células, sendo necessário que o quitosano possua um peso molecular baixo (Liu, Guan, Yang, Li & Yao, 2000). Os autores verificaram ainda que nem todos os tipos de quitosano apresentaram esta propriedade concluindo que poderá depender do número de grupos amina ( $\text{NH}_3^+$ ). Também poderá atuar como quelante de metais e de elementos essenciais ao crescimento dos microrganismos. Segundo Senel & McClure (2004), o efeito antibacteriano do quitosano é maior em bactérias gram-positivas do que em gram-negativas e é afetado pelo pH, sendo maior a baixos valores de pH. Em soluções ácidas, o quitosano, sendo carregado positivamente, interfere com os resíduos negativos da parede celular, provavelmente, por competição com os íons de cálcio, levando ao aumento da permeabilidade da membrana (Begin, & Calsteren, 1999; Senel, 2004). A inibição bacteriana provocada por este polímero depende de vários factores incluindo, características do quitosano, do ambiente e dos microrganismos (Raafat, Bargaen, Haas & Sahl, 2008)

#### **I.4.4.4 Anticolesterol**

Alguns estudos afirmam a possibilidade do quitosano permitir baixar os níveis de triglicerol plasmático e hepático e do colesterol total, exibindo efeitos hipolipidémicos e hipocolesterolémicos. Liu, Zhang & Xia (2008) reportaram que a ingestão de quitosano com alto grau de desacetilação diminuiu, significativamente, os níveis de colesterol e LDL e aumentou os de HDL. Foi também descrito que o quitosano tem alta capacidade de ligação à gordura *in vitro* (Zhou, Xiab, Zhang & Liangli, 2006). Vários estudos confirmaram a eficácia do uso do quitosano por via oral, em diminuir a absorção de lípidos, sendo vários os mecanismos propostos. Estes compreendem, o aprisionamento de lípidos na solução viscosa polissacarídea reduzindo a absorção de gordura e de colesterol dietéticos, a interação através de forças electrostáticas entre os grupos amino do quitosano e substâncias aniónicas como os ácidos gordos, formação de sais de quitosano a partir da conjugação com ácidos biliares levando à sua interação hidrofóbica com o colesterol e os lípidos (Muzzarelli et al, 2006), formação de micelas com quitosano ou, por fim a adsorção do quitosano à superfície de emulsões de lípidos formando uma proteção contra a ação das lípases e conseguinte absorção (Liu et al., 2008). Dos vários estudos, as características que permitiam uma melhor ligação aos lípidos ou ácidos biliares variaram (Aranaz et al., 2009) contudo, parece que os efeitos são mais pronunciados quando as partículas são mais finas e apresentam um alto grau de desacetilação ou de peso molecular (Liu et al., 2008).



Em animais com insuficiência renal crónica a hiperfosfatémia é uma consequência que tem de ser controlada. O quitosano foi utilizado na formação de um composto contendo carbonato de cálcio (Epakitin®, Vétoquinol Canada Inc.). Este composto permite a quelação intestinal de fosfato, reduzindo a sua absorção e concentração sérica. É contudo, necessário monitorizar a relação cálcio/fósforo e o peso dos animais, visto também se ligar à gordura (Vaden, 2010).

#### **I.4.4.5 Engenharia dos tecidos**

A engenharia dos tecidos integra a tecnologia e a ciência de forma a manter ou a reparar os tecidos do corpo. Matrizes extracelulares são dispositivos utilizados como suportes para o crescimento e proliferação de células, fornecendo um ambiente estável. Os materiais biológicos serão mais apropriados do que os sintéticos porque são mais compatíveis com o ambiente natural dos tecidos (Laranjeira & Fávere, 2009).

A estrutura deve permitir a adesão e o crescimento celular à superfície, apresentar estrutura tridimensional, nenhum componente ou subproduto da sua degradação deve provocar reações inflamatórias ou tóxicas, a porosidade deve proporcionar elevada área de superfície para interação célula-matriz e permitir a regeneração da matriz extracelular. Devido à baixa atividade imunogénica, biodegradabilidade e estrutura porosa, o quitosano tem sido estudado para formação de filmes e fibras. (Laranjeira & Fávere, 2009). Existe uma relação direta entre a degradabilidade e o grau desacetilação com a capacidade de adesão às células. Num estudo, a utilização de matrizes com quitosano fosforilado permitiu acelerar a reparação do rádio e tibia de coelhos e suportar a proliferação e diferenciação de osteoblastos, promovendo a mineralização óssea (Wang, Ma, Wang & He, 2002). Noutro estudo em que avaliaram as propriedades cicatrizantes do quitosano, verificaram que houve um encurtamento de, aproximadamente, uma semana no tempo de reparação de fracturas em cães (Khanal et al., 2000).

#### **I.4.4.6 Sistemas de libertação de fármacos**

A procura de novos sistemas de libertação controlada de fármacos tem sido muito relevante no sentido de estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar fármacos com mais segurança e com efeitos secundários mais reduzidos. Vários sistemas com quitosano foram descritos permitindo a libertação controlada de fármacos, péptidos, proteínas, vacinas e ADN. O quitosano apresenta características biofarmacêuticas

que podem possibilitar a sua utilização a nível ocular, nasal, oral, parenteral ou transdermal como biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade e um comportamento biológico favorável como bioadesão e aumento da permeabilidade (Aranaz et al., 2009).

Para transporte de fármacos, os meios com composição de quitosano mais utilizados são matrizes sólidas e nano ou micropartículas. A sua utilização como revestimento, também tem sido realizada permitindo alterar as propriedades de superfície, ou melhorar a interação com as estruturas em redor, melhorando a biodegradabilidade do sistema (Rodrigues et al., 2012). O quitosano tem demonstrado melhorar as propriedades de dissolução e de biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis, sendo importante ter em consideração as suas características como o grau de desacetilação e o peso molecular. A carga positiva que possui, permite a interação com polímeros de carga negativa, macromoléculas e polianiões formando complexos polielectrolíticos em meio aquoso (Laranjeira & Fávere, 2004). Segundo Aranaz et al. (2009), na formação de sistemas de libertação de fármacos, deve-se utilizar um quitosano com alto peso molecular e elevado grau de desacetilação.

#### **I.4.4.7 Outras aplicações**

Alguns estudos afirmam que o quitosano apresenta atividade antitumoral, induzindo a inibição do crescimento de células tumorais por ter um efeito estimulante do sistema imune. Contudo, esta propriedade é controversa (Kim & Rajapakse, 2005); Jeon e Kim (2002) utilizaram oligossacarídeos de quitosano com diferentes pesos moleculares, verificando inibição do crescimento de células tumorais em ratos e aumento da taxa de sobrevivência com os que apresentavam um PM entre 1,5 e 5,5 KDa. Embora seja sugerido que a ativação de macrófagos possa mediar os seus efeitos antitumorais, Ueno et al (2001) não descartam que as suas propriedades angiogénicas possam promover o crescimento e invasão de tumores.

Outra propriedade referida é a indução de analgesia pela quitina e pelo quitosano. Okamoto, et al. (2002b) observaram que o quitosano acelerava a cicatrização de feridas, reduzia a frequência de tratamento, diminuía a dor e protegia a superfície da ferida. Foi proposta que a diminuição de dor se deva à absorção de prótons libertados pela inflamação sendo, contudo, um efeito inferior ao da quitina que absorveu bradiquininas. Outros estudos utilizam o quitosano como transportador de moléculas quimioterápicas e anti-inflamatórias.

Foi demonstrada a reação do quitosano contra diferentes radicais, sendo os resultados comparados com antioxidantes comerciais (Aranaz et al., 2009). O facto de o quitosano

apresentar carga positiva permite-lhe interagir com moléculas negativas como o ADN, sendo realizados estudos que permitem o transporte pelo quitosano de porções desta molécula e a sua libertação (Aranaz et al., 2009).

Num estudo, utilizaram nanopartículas com oligómeros de quitosano e ácido hialurónico para transportar genes obtendo a expressão de fosfatase alcalina em células epiteliais da córnea e a entrada e assimilação em células da córnea e conjuntiva de coelhos após administração tópica, concluindo que poderiam ser utilizadas em determinadas doenças crónicas (de la Fuente, Seijo & Alonso, 2008).

## **I.5 Sistemas de libertação de fármacos oculares**

Vários mecanismos têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar o tempo de permanência de fármacos e/ou aumentar a sua difusão a nível da córnea. As características do quitosano que incluem mucoadesão, aumento da permeabilidade de epitélios, biodegradabilidade, facilidade de cicatrização de feridas e ser agente hemostático poderão contribuir para a sua utilização em de lesões corneais.

### **I.5.1 Barreiras a ultrapassar na libertação de fármacos tópicos oculares**

A administração tópica de fármacos tem como objetivo tratar doenças oculares superficiais na região précorneal, como infeções que incluem conjuntivites, blefarites ou queratites e, proporcionar tratamento intraocular através da córnea, no caso de uveíte ou glaucoma (Sánchez, 2003). As formas mais utilizadas atualmente para aplicação tópica são os colírios. No entanto, estas formas líquidas têm a desvantagem de permanecerem um curto espaço de tempo em contacto com a mucosa ocular, por ocorrer perda pré-corneal rápida e ampla, provocada pela drenagem através do aparelho lacrimal. A drenagem é favorecida pelo pestanejar e taxa de renovação das lágrimas. Outros factores correspondem à mistura e diluição com a película lacrimal que ocorre após instilação, à capacidade limitada de retenção pela superfície ocular e à absorção pela conjuntiva e ducto nasolacrimal (Sánchez, 2003; Achouri et al., 2012). Segundo Shell (citado por Achouri et al., 2012)<sup>5</sup>, o pH das soluções também influencia o tempo de retenção, na medida em que um pH ácido utilizado para manter a estabilidade de alguns fármacos alcalóides e bases fracas produz irritação e aumento da lacrimejo e consequente diluição. Em termos do transporte para o interior do olho, a maior barreira é a própria córnea. O epitélio da córnea impede a passagem de compostos hidrofílicos, enquanto o estroma impede a passagem de compostos hidrofóbicos (Sánchez, 2003).

A conjuntiva, pelo facto de, possuir uma área grande comparativamente à córnea, permite absorver uma maior quantidade de fármaco do que a última, contudo, esta é considerada uma via não utilizável, visto os fármacos poderem atingir a circulação sistémica (Sánchez, 2003). Stjernschantz e Astin (citado por Achouri, 2012)<sup>6</sup> descrevem a esclera como sendo constituída por fibras de colagénio e glicoproteínas, pelo que, a sua permeabilidade pode ser comparada à

---

<sup>5</sup> Shell, J.W. (1982). Pharmacokinetics of topically applied ophtalmic drugs. *Surv Ophtalmology*, 26, 207-218.

<sup>6</sup> Stjernschantz, J. & Astin M. (1993). Anatomy and physiology of the eye, physiological aspects of ocular drug therapy. In: edman, P. editor. *Biopharmaceutics in Ocular Drug Delivery*. Boca Raton: CRC Press, 1-25.

do estroma da córnea. É então, mais permeável a substâncias hidrofílicas, negativas e de baixo peso molecular.

Um sistema de libertação ocular ideal deveria permitir apenas uma ou duas instilações diárias, mantendo uma concentração de fármaco adequada no local correto (Sánchez, 2003), não provocar efeitos sistémicos ou efeitos de toxicidade, não induzir uma sensação de corpo estranho, ser fácil de administrar, esterilizável e possível de ser armazenado sem serem necessárias condições especiais (Thakur & Khasiv, 2011; Achouri et al., 2012).

### **1.5.2 Mecanismos de libertação controlada de fármacos**

Os materiais podem ser utilizados como constituintes da matriz do sistema de libertação ou no revestimento do mesmo. Considerando as matrizes, os materiais são usualmente hidrofílicos e expansíveis. Quando em contacto com meios aquosos, passam por um processo de hidratação, seguindo-se uma libertação contínua do fármaco por difusão. Fazem parte deste grupo: os polímeros de celulose, os polissacarídeos como o alginato de sódio ou o quitosano, que podem ser utilizados sozinhos ou em conjunto. Geralmente, materiais com rápida hidratação são preferíveis em matrizes hidrofílicas. A libertação rápida inicial pode tornar-se incontrolável e potencialmente insegura, pelo que a utilização de agentes de revestimento insolúveis ou a modificação dos excipientes pode ser necessário (Gao et al., 2011). A libertação de fármacos depende da degradação da matriz e da difusão da substância do polímero quando são utilizados materiais biodegradáveis, não necessitando de serem removidos. Podem ser naturais ou sintéticos, e ser hidrolisados ou degradados por enzimas sendo, eventualmente, absorvidos ou metabolizados em água. Compostos naturais têm a vantagem de serem similares à matriz extracelular e serem biocompatíveis, contudo, não têm propriedades mecânicas adequadas, o que implica que sejam utilizados em conjunto com outros materiais. Pelo contrário, materiais sintéticos apresentam boas propriedades físico-químicas e alta reprodutibilidade de resultados (Huang & Fu, 2010).

A combinação de diferentes materiais permite facilitar o ajustamento para o padrão de libertação desejado e melhorar a estabilidade contudo, são sistemas mais complexos em que os polímeros podem ser incompatíveis (Siepmann, Siepmann, Walther, MacRae & Bodmeier, 2008).

Materiais de revestimento são utilizados para cobrir um núcleo carregado de fármaco (Gao et al., 2011).

### **I.5.2.1 Pró-fármacos**

Pró-fármacos são derivados inativos de moléculas que são convertidos na sua forma ativa após hidrólise química ou enzimática no interior do olho (Thakur & Kashiv, 2011). Foram desenvolvidos, de modo, a aumentar a biodisponibilidade e a reduzir as reações adversas. A utilização nesta forma pode aumentar a lipofilicidade, o que, lhes permite atravessar barreiras antes intransponíveis, aumentar a solubilidade, a estabilidade do fármaco e obter concentrações de fármaco intraoculares muito superiores à substância ativa (Achouri et al., 2012).

### **I.5.2.2 Soluções e hidrogéis**

Os géis permitem um tempo de permanência na área précorneal superior às soluções, diminuindo a frequência de administração contudo, é mais difícil aplicar uma dose correta. Os polímeros mais utilizados para soluções viscosas são polímeros hidrofílicos como derivados da celulose (hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) ou metilcelulose), derivados poli (acrílico) como carbómero, polivinilpirrolidona (PVP), polivinil álcool, ácido hialurónico ou alginato de sódio. Podem ser géis preformados ou géis formados *in-situ* (Achouri et al., 2012). A utilização de materiais bioadesivos possibilita a ligação às membranas de mucina e a redução da taxa de drenagem. Normalmente, apresentam pesos moleculares altos, não conseguindo atravessar as membranas. Alguns géis preformados são utilizados no caso de queratoconjuntivite seca (Ludwig, 2005). Berezin, Moskalenki, Chemyakov, Skorik & Khutoryanskiy (2013) compararam um gel de um derivado do quitosano solúvel em água com um de hidroxietilcelulose verificando que o primeiro apresentava maior capacidade aderente ao muco e libertação prolongada. Almeida e Fonseca (2007) prepararam e avaliaram hidrogéis formados com gelatina ou quitosano e agentes ligantes, concluindo que ambos eram bons materiais para sistemas de libertação de fármacos contudo, os com composição de quitosano apresentaram um padrão de libertação mais lento e com menor concentração de fármaco do que era expectável.

Hidrogéis formados *in-situ* são líquidos viscosos que passam por uma fase solução-gel após exposição a determinados factores, formando um gel viscoelástico (Achouri et al., 2012). Estas formulações que permanecem em solução no frasco de armazenamento, por alteração do pH, temperatura ou concentração de iões transformam-se em gel no saco conjuntival (Thakur & Kashiv, 2011). Gupta, Jain, Mathur, Mishra & Valpandian (2007) avaliaram a libertação de

fármaco num sistema de formação de gel-*in situ* dependentes da temperatura e pH, utilizando quitosano como polímero sensível ao pH e promotor de permeabilidade. Observaram um maior transporte através da córnea e um aumento do tempo de retenção. Noutro estudo, Varshosaz et al. (2008) utilizaram várias misturas com diferentes concentrações de quitosano e de outro polímero, formando uma solução que se convertia em gel em condições fisiológicas (pH 7,4 e 37°C) e avaliaram a libertação e eficácia de ciprofloxacina. Gupta et al. (2013) avaliaram a combinação de nanopartículas incorporadas num gel *in situ* de quitosano para libertação de esparfloxacina (0.4%) e verificaram que ocorreu uma adequada taxa de libertação. No estudo de um gel *in situ* induzido pelo pH para libertação de levofloxacina e constituído por carbopol e outros agentes como a hidroximetilcelulose, Sanjay, Chetan, Karmendu & Sanket (2010) comprovaram um aumento da biodisponibilidade do fármaco.

O quitosano é um polímero que tem a capacidade de absorção em solventes aquosos, de passar por uma transição líquida gel e que pode ser preparado em diferentes concentrações (Achouri et al., 2012).

#### **I.5.2.3 Promotores de permeabilidade**

Consiste na utilização de substâncias que facilitam a passagem de fármacos através da córnea. São também denominados como promotores de absorção ou acelerantes. Atuam ao nível das células diminuindo a resistência da barreira e aumentando, transitoriamente, a sua permeabilidade. Podem ser surfatantes que alteram as propriedades físicas das membranas celulares ou substâncias como o ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) que permitem afastar as células epiteliais facilitando o transporte paracelular (Achouri et al., 2012).

As Ciclodextrinas são moléculas com uma estrutura em caixa, uma superfície hidrofílica e um centro lipofílico que permitem várias aplicações (Short, 2008). A utilização de ciclodextrinas proporciona o aumento da solubilidade de substâncias lipofílicas, a sua estabilidade e a redução do efeito de irritação local (Achouri et al., 2012).

#### **I.5.2.4 Sistemas coloidais**

Como exemplos destes sistemas existem os lipossomas, as nanocápsulas e as nanopartículas (Thakur & Kashiv, 2011). Proporcionam um aumento do tempo de contacto, diminuindo a

frequência de administração e conferem proteção do fármaco face à inativação enzimática (Achouri et al., 2012).

Os lipossomas são estruturas em forma de esfera compostas por uma ou mais camadas concêntricas de membranas lipídicas em redor de um centro líquido hidrofílico (Weiner & Gilbert, 2010). O seu uso permite a libertação de fármacos com baixa solubilidade, ou peso molecular médio ou alto. São anfifílicos, podendo transportar moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas. Dependendo da sua composição podem apresentar uma superfície com carga positiva, negativa ou neutra contudo, considerando que a camada de mucina tem carga negativa, os lipossomas com carga positiva ou neutra serão mais interessantes (Hathout, Mansour, Mortada & Guinedi, 2007).

Mehanna, Elmaradny e Samaha (2010) verificaram que cobrir lipossomas com um polímero bioadesivo como o quitosano melhorou a penetração de ciprofloxacina. Estudos *in vitro* demonstraram que o perfil de libertação foi mais lento do que os lipossomas sem revestimento. Esta formulação permitiu inibir o crescimento bacteriano de *P. aeruginosa* nos olhos de coelhos durante 24 h e melhorou os sintomas logo após o primeiro dia. Noutro estudo, Zhang e Wang (2009), tentaram melhorar a estabilidade dos lipossomas ao utilizarem um derivado do quitosano (cloreto de N-trimetil quitosano) de forma a modificarem a superfície de lipossomas com coenzima Q10. Este derivado apresentou uma solubilidade em água a pH fisiológico, superior ao quitosano. Verificaram que não era irritante a concentrações baixas de 0,1-1% e que aumentava o tempo de permanência precorneal. Li et al. (2009) revestiram lipossomas com quitosano de baixo peso molecular (8 KDa) obtendo um perfil de libertação mais prolongado e um efeito potencial de aumento de permeabilidade.

Sendo os lipossomas quimicamente instáveis e passíveis de degradação oxidativa desenvolveram-se os nanossomas, mais estáveis quimicamente (Thakur & Kashiv, 2011). São estruturas com bicamada, biodegradáveis e não iónicas; tal como os lipossomas podem transportar substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas. Investigadores estudaram o efeito de cobrir nanossomas contendo maleato de timolol com polímeros mucoadesivos, que incluíram o quitosano. Verificaram que obtinham um efeito terapêutico mais regular durante 8 horas, comparando com a formulação convencional e que o efeito era superior, necessitando apenas de metade da concentração para o mesmo efeito (Aggarwal & Kaur, 2005). O estudo da farmacocinética e farmacodinâmica permitiu concluir que a concentração máxima foi de 1,7 vezes superior à da solução controlo e foi mantida durante 2 horas. Comprovou-se que ocorria



libertação regular com a formulação de nanossomas e quitosano (Kaur, Aggarwal, Singh & Kakkar, 2010).

Raghuwanshi, et al (2012) investigaram a utilização de nanossomas para libertação de levofloxacina e verificaram que ocorreu uma diminuição da libertação comparando com a solução convencional, sendo que esta dependia da composição das moléculas transportadas.

Vários outros mecanismos foram desenvolvidos, como é o caso de cubossomas que são definidos como nanopartículas numa fase líquida cristalina com simetria cristalográfica cúbica formada por moléculas tipo surfatante ou ampifílicas, de microemulsões definidas como dispersões de água e lípidos facilitada pela combinação com surfatante ou de nanoemulsões que são emulsões de gotas com tamanho inferior a 1µm (Achouri et al., 2012).

Sistemas de libertação particulados incluem as nanopartículas (1-1000 nm), as micropartículas (1-1000 µm), as nanocápsulas e as microcápsulas (Short, 2008). As nanopartículas têm um diâmetro inferior a 1µm e são formadas por materiais biodegradáveis naturais ou sintéticos, nas quais os fármacos são dissolvidos ou encapsulados, podendo ser integrados na matriz ou ligados à superfície. Permitem administrar fármacos hidrofóbicos de forma tolerável para o olho (Achouri et al., 2012). Podem ser nanosferas que permitem uma dispersão uniforme do fármaco ou nanocápsulas com uma cavidade central envolvida por uma membrana polimérica. As desvantagens relacionam-se com a possível acumulação nos tecidos e agregação. Motwani et al. (2008) produziu nanopartículas de quitosano e alginato de sódio contendo gatifloxacina, confirmando que ocorria libertação rápida na primeira hora, seguida de uma libertação mais gradual durante 24 horas. Noutro estudo (El- Soudi et al., 2013) prepararam nanopartículas de quitosano e ácido hialurónico que permitiam uma libertação mais lenta, diminuindo a entrada do fármaco na córnea, quando comparadas com uma matriz de HPMC. Gupta et al. (2011), desenvolveram nanopartículas contendo levofloxacina e verificaram uma libertação rápida inicial, seguida por uma libertação prolongada por 24 horas. Esta formulação mostrou eficácia microbiológica semelhante à formulação comercializada.

Microsfersas poliméricas são atrativas devido à sua biocompatibilidade, capacidade de encapsulamento de várias substâncias e administração por diferentes vias contudo, são difíceis de produzir em grande quantidade e de manter a estabilidade (Gao et al., 2011).

#### **I.5.2.5 Iontoforese**

Consiste na utilização de moléculas carregadas e do seu transporte para os tecidos. É um método minimamente invasivo que propõe compostos carregados, como fármacos, com PM baixo e proteínas biológicas com PM alto (cerca de 15KDa) para os tecidos oculares. Utiliza uma corrente elétrica pequena com a mesma carga que o fármaco, de forma a criar forças repulsivas e permitir a penetração do mesmo para os tecidos. O fármaco é aplicado com um eletrodo com a mesma carga da molécula e um eletrodo terra com carga oposta é colocado noutro local do corpo para completar o circuito (Eljarrat-Binstock & Domb, 2006).

#### **I.5.2.6 Lentes de contacto**

As lentes de contacto podem absorver soluções com fármacos hidrofílicos mantendo-os no componente aquoso das lentes e libertando-os posteriormente quando aplicadas no olho. Permitem aumentar o tempo de contacto contudo, resultam numa libertação rápida de algumas horas (Weiner & Gilbert, 2010).

#### **I.5.2.7 Implantes**

Os implantes apresentam a vantagem de permitirem libertar concentrações terapêuticas do fármaco constante com efeitos secundários mínimos. Podem ser biodegradáveis, não necessitando de extração, ou não biodegradáveis que permitem uma libertação controlada por longos períodos de tempo (Short, 2008). Os primeiros possuem, normalmente, uma libertação rápida e de grande quantidade de fármaco seguida por um declínio lento, podendo ser utilizados para tratar doenças agudas que necessitem de uma dose de carga. Ao alterar a sua composição pode-se modificar a forma de libertação (Weiner & Gilbert, 2010).

#### **I.5.2.8 Pensos oculares<sup>7</sup>**

São preparações estéreis que prolongam o tempo de permanência do fármaco com uma libertação controlada e que são menos afetados pela drenagem nasolacrimal. Alguns exemplos são o ocusert (disco de pilocarpina-alginato entre dois discos de uma membrana porosa) que permitiu libertação durante 7 dias, o Lacrisert® (Valeant Ophthalmics, USA) para tratamento

---

<sup>7</sup> Tradução livre de *ocular insert*

de queratite seca, ao absorver água, forma uma película hidrofílica que lubrifica a córnea ou o SODI (*Soluble ocular drug insert*) que é uma película que hidrata rapidamente, transformando-se numa massa viscosa e, por fim, em solução que permite administração de fármacos durante 24h (Venkata, Madhavi & Rajesh, 2011).

Os pensos podem conter um depósito central ou um centro sólido revestido pelo fármaco. Se forem constituídos por materiais não erosivos, não são biodegradáveis necessitam de remoção do olho (Weiner & Gilbert, 2010). Gilhotr, Gilhotr & Mishra (2010) desenvolveu um mini penso bioadesivo de gatifloxacina (4%) utilizando alginato de sódio, quitosano e gluconato de cálcio em diferentes concentrações. O penso contendo 16% de quitosano permitiu uma libertação constante durante 24 horas, não era irritante, sendo seguro e apresentando uma boa eficácia antimicrobiana. Num estudo de preparação e avaliação de pensos contendo brimonidina, Aburahma e Mahmoud (2011), utilizaram a polivinilpirrolidona K-90 como matriz em conjunto com diferentes polímeros. De entre os polímeros testados usaram dois quitosanos com peso molecular baixo e médio contudo, apenas os discos com alginato de sódio prosseguiram o estudo. Amar et al. (2012) prepararam várias matrizes contendo diferentes concentrações de glicerina, quitosano e Betaxolol a 0.33 e 1% verificando que os que possuíam 3 % de quitosano e 20% glicerina permitiram a libertação do fármaco durante 12 horas. Este tipo de sistemas também foi utilizado para atrasar a libertação de levofloxacina utilizando diferentes polímeros. Outros sistemas têm sido desenvolvidos, sendo que um destes pensos consistiu num híbrido hidrogel polimérico com quitosano permitindo prolongar a libertação de alguns fármacos (Verestiuc et al., 2006).

## **II. Objetivos**

A aplicação tópica de gotas implica, por vezes, um tratamento frequente o que pode diminuir a adesão ao tratamento por parte dos donos dos animais e a eficácia do tratamento. Assim, surgiu o interesse em desenvolver pensos oculares com soluções de antibióticos que libertassem o seu princípio ativo lentamente, para utilização em animais. Neste trabalho foram avaliadas as características de discos de quitosano impregnados com três antibióticos (Levofloxacina, gentamicina e ceftriaxona), em diferentes concentrações, de forma a verificar a sua libertação ao longo do tempo

## **III. Material e métodos**

### **III.1 Material**

Para a realização deste trabalho foi utilizado quitosano presente na forma de pensos absorventes Absorki (Ceramed, Portugal) desenhados para absorverem o exsudado de feridas como por exemplo, feridas traumáticas, cirúrgicas ou com exsudado. Este quitosano possui um PM de 500 KDa e cerca de 80% grau de desacetilação. Tendo sido obtido de camarão. Nos pensos foram incorporados dois antibióticos em pó, a levofloxacina e o sulfato de Gentamicina e uma solução de Ceftriaxona (1gr/10mL), obtendo-se as concentrações finais em percentagem massa /massa de 2,5%, 7,5% e apenas para a primeira molécula de 10% e 30%.

### **III.2 Métodos**

#### **III.2.1 Preparação dos pensos**

Os pensos foram preparados da mesma forma que os pensos absorventes, com exceção da incorporação dos antibióticos no passo de dissolução do quitosano com uma solução de ácido acético. Posteriormente, os pensos são submersos numa solução aquosa de amónia, lavados com água e liofilizados no molde final. Numa primeira fase foram produzidos pensos com os três agentes microbianos na percentagem de 2,5% e 7,5% e numa segunda fase os de Levofloxacina foram produzidos com uma percentagem de 10% e 30%.

### **III.2.2 Avaliação das características físicas**

Para a avaliação das características físicas foram considerados 8 pensos de quitosano sem antibiótico (Branco1) e 3 de cada uma das restantes concentrações. Os pensos foram avaliados de forma subjetiva tendo em conta a cor, textura e aparência, e de forma objetiva, considerando, o diâmetro, espessura e a sua uniformidade. O peso foi obtido numa balança analítica (Mettler AE200) aceitando-se um erro de 10 miligrama (mg) e o diâmetro e espessura foram medidos, de forma simples, utilizando uma régua, admitindo-se por isso, um erro de 1 milímetro (mm).

### **III.2.3 Teste de absorção de água**

Este teste foi realizado, de forma a avaliar a hidrofiliidade e hidratação do polímero, visto afetar a libertação do fármaco a partir da matriz. Como se possuía poucos pensos para a realização deste ensaio, optou-se por pesá-los e dividi-los ao meio, de forma, a se obter duas medições. Cada metade foi colocada no tubo de plástico esterilizado contendo 2,5 mL de água duplamente desionizada, à temperatura ambiente. Em intervalos específicos de 2 minutos até aos 10 min. e depois aos 30 min., os pensos foram recolhidos dos tubos com ajuda de uma pinça, foi retirado o excesso de água à superfície com um pouco de papel e foram pesados numa balança analítica (Mettler AE200) sobre papel de alumínio. No final da medição foram recolocados no mesmo tubo.

O grau de absorção de líquido foi calculado como índice de absorção utilizando a equação:

$$\text{Índice de absorção: } \frac{Pt - Pi}{Pi} \times 100$$

Onde, Pi corresponde ao peso inicial e Pt é o peso num tempo t.

### **III.2.4 Determinação do pH**

O pH corresponde ao logaritmo negativo da concentração do ião hidrogénio ( $H^+$ ), sendo uma medida do grau de acidez ou alcalinidade de uma solução.

Os pensos ao serem colocados dentro de uma solução absorvem uma parte do líquido até atingirem um equilíbrio, a partir do qual começam a difundir o antibiótico e, possivelmente, de componentes da matriz para o meio. A determinação do pH foi realizada com o medidor de

pH (Hanna HI4521), na água onde os pensos ficaram mergulhados cerca de 2 horas após a realização do teste de absorção de água.

### III.2.5 Estudos microbiológicos

Foi utilizada a técnica de difusão de disco em agar para avaliar e comparar, numa primeira etapa, a difusão de um disco de quitosano com igual concentração de fármaco ao de um disco padrão utilizado no TSA e numa segunda fase a difusão de pensos de quitosano com diferentes concentrações de antibiótico.

As bactérias utilizadas eram de referência e foram *Staphylococcus aureus* ATTC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853. Inicialmente, foi necessário efetuar a cultura de bactérias conservadas por congelação em meio sólido agar sangue Columbia e em meio líquido BHIB (*Brain heart infusion broth*) utilizando ansas descartáveis, de forma a evitar contaminações e incubando em estufa a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Os TSA são utilizados para avaliar a sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos *in vitro*, de forma a se conseguir escolher aquele que é mais eficaz, quando administrados sistemicamente. Estes métodos podem ser qualitativos, definindo os microrganismos como susceptíveis, intermédios ou resistentes, ou quantitativos atendendo às CMI ( $\mu\text{g/mL}$  ou  $\text{mg/L}$ ) (Guiguère et al., 2006).

A metodologia de Kirby e Bauer para antibiograma é a mais difundida e utilizada na rotina de análises clínicas, por ser prática, de baixo custo e permite obter resultados confiáveis. Para a realização do TSA são utilizados vários discos com agentes antimicrobianos selecionados tendo em conta as características do microrganismo, consistindo na difusão de um antibiótico a partir de um disco padrão, que é colocado na superfície de um agar padrão (Agar Mueller-Hinton), numa placa de Petri. A difusão do antibiótico origina um gradiente de concentração, sendo maior mais próximo do disco e à medida que se vai afastando torna-se mais diluído, de forma a não conseguir inibir o crescimento de microrganismos. Forma-se uma zona de inibição que em condições padrão é inversamente proporcional à CMI (Guiguère et al., 2006). O agar tem de ter 4mm de espessura e é semeado com, aproximadamente,  $1\text{-}2 \times 10^8$  CFU/mL de cultura pura, correspondendo a 0,5 na escala de MacFarland e os discos devem ser colocados afastados equitativamente. Alteração destes factores altera a difusão de antibiótico e a formação do halo de inibição, impossibilitando a sua interpretação (Guiguère et al., 2006).

Para a realização do teste de difusão em disco segundo as normas do CLSI, devem-se utilizar as colónias de bactérias provenientes de cultivo recente (18 e 24 horas), isoladas de meios não seletivos e promover uma suspensão com solução salina estéril até obter uma turvação equivalente ao grau 0,5 da escala de MacFarland. A inoculação da suspensão é feita com uma zaragatoa embebida anteriormente na suspensão. Os discos de papel impregnados com antimicrobianos são distribuídos sobre a superfície do meio e separados entre si por não menos de 24mm. As placas de Petri são invertidas e incubadas em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas.

Com o auxílio de uma régua mede-se o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco, e comparam-se os valores com o de uma tabela apropriada para determinar se a bactéria em análise é sensível, intermédia ou resistente ao antimicrobiano testado.

Na primeira etapa, para preparar os pensos de quitosano com uma concentração igual à dos discos padrão, foi necessário preparar soluções de antibiótico e cortar os discos sem antibiótico, de forma, a ficarem com cerca de 6mm de diâmetro (equivalentes aos discos padrão utilizados) com bisturi e pinça esterilizados. As soluções apresentavam uma concentração de 1mg/mL para a gentamicina e de 0,5mg/mL para a levofloxacina, de forma a uma gota de 10µL conter 10µg de gentamicina ou 5µg de levofloxacina. Estas soluções foram esterilizadas através de um filtro Millex-GP (Millipore Corporation, USA) de 0,22 µm e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Em seguida foi colocada uma gota de 10 µL sobre cada disco e estes foram colocados a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas para absorção da solução.

A realização do TSA ocorreu de acordo com o método já descrito anteriormente. Foram utilizados dois discos de gentamicina e de levofloxacina para cada espécie bacteriana, sendo os testes validados com discos padrão dos mesmos antibióticos para os mesmos microrganismos (Tabela 6).

Tabela 6: Número de discos utilizados na primeira etapa dos testes microbiológicos.

	Número de discos (unidade)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>Padrão de Gentamicina</b>	2	2
<b>Branco+10µg de Gentamicina</b>	2	2
<b>Padrão de Levofloxacina</b>	1	1
<b>Branco+5µg de Levofloxacina</b>	2	2

Na segunda etapa, foram utilizados os pensos de quitosano com o diâmetro inicial e diferentes concentrações de antibiótico, de forma, a avaliar a difusão dos últimos quando incorporados durante o processo de formação. Na Tabela 7 estão listados o número de pensos de quitosano utilizados nesta etapa.

Tabela 7: Número de pensos utilizados na segunda etapa dos testes microbiológicos.

	Percentagem de fármaco	Número de discos (unidade)	
		<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
<b>Branco1</b>	-	1	1
<b>Levofloxacina</b>	2,5%	2	2
<b>Levofloxacina</b>	7,5%	1	1
<b>Gentamicina</b>	2,5%	2	2
<b>Gentamicina</b>	7,5%	1	1
<b>Branco2</b>	-	1	1
<b>Levofloxacina</b>	10%	1	1
<b>Levofloxacina</b>	30%	1	1

Segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), o intervalo de referência utilizado no controlo de qualidade para os discos de gentamicina é de 19 a 27mm para *S. aureus* e 16 a 21mm para *P. aeruginosa*, enquanto para a levofloxacina é de 25 a 30mm para *S. aureus* e 19 a 26mm para *P. aeruginosa*.

Todos os procedimentos foram realizados numa câmara de fluxo laminar para evitar possíveis contaminações.

### III.2.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com recurso ao programa Excel 2010 do Microsoft Office® (Microsoft Corporation, EUA). Utilizou-se a estatística descritiva, apresentando os resultados como média  $\pm$  desvio padrão.



## IV. Resultados

### IV.1 Características físicas

Tendo em conta a avaliação das características físicas, os pensos foram inspecionados visualmente. Todos apresentavam uma coloração branca, à exceção dos que continham levofloxacina a 10% e 30% que mostravam uma cor amarelada. Em relação à textura, a maioria detinha uma superfície suave e homogênea, à exceção dos discos sem antibiótico (Branco) que possuíam uma superfície mais irregular e rugosa.

Em relação ao diâmetro (Tabela 8), a maioria possuía diâmetro superior a 1 cm, valor pretendido, apresentando-se entre 1 e 1,50 cm. Os pensos mais uniformes foram os de levofloxacina a 10 e 30% e o Branco2, embora fossem os que apresentavam maior diâmetro. A espessura variou entre 0,10 e 0,3 cm, com um desvio padrão baixo nos discos de levofloxacina 2,5%, 7,5% e 30% e gentamicina 2,5% demonstrando uniformidade (Tabela 8). Contudo, tem-se de considerar que alguns discos, quando considerados individualmente, não apresentavam uma espessura constante, sendo esta variável em cerca de 1 mm ou menos.

Considerando o valor do peso em todos os pensos, este variou entre 5 mg e 18,6 mg, apresentando um desvio padrão de 3,74 que corresponde a 37% do valor médio que foi de 10,15 mg (Tabela 9). A maioria apresentou um peso inicial igual ou inferior a 10 mg, sendo que os que apresentavam um peso maior foram o Branco1 com 16 mg e gentamicina 7.5% com 11mg (Tabela 8).

Tabela 8: Caracterização de pensos de quitosano com diferentes concentrações de antibiótico quanto ao diâmetro, espessura e peso.

	Percentagem de fármaco (%)	Diâmetro (cm)	Espessura (cm)	Peso (mg)
<b>Branco 1</b>	0	1,28 ± 0,1	0,27 ± 0,1	15,85 ± 2,5
<b>Branco 2</b>	0	1,40 ± 0,0	0,17 ± 0,0	9,50 ± 0,2
<b>Levofloxacina</b>	2,5	1,33 ± 0,1	0,10 ± 0,0	6,57 ± 0,1
<b>Levofloxacina</b>	7,5	1,17 ± 0,1	0,10 ± 0,0	5,47 ± 0,6
<b>Gentamicina</b>	2,5	1,40 ± 0,1	0,15 ± 0,0	8,13 ± 1,5
<b>Gentamicina</b>	7,5	1,32 ± 0,1	0,17 ± 0,1	10,73 ± 1,7
<b>Ceftriaxona</b>	2,5	1,18 ± 0,1	0,12 ± 0,0	8,20 ± 1,1
<b>Ceftriaxona</b>	7,5	1,33 ± 0,1	0,13 ± 0,1	7,10 ± 0,6
<b>Levofloxacina</b>	10	1,50 ± 0,0	0,17 ± 0,0	10,20 ± 0,4
<b>Levofloxacina</b>	30	1,47 ± 0,0	0,10 ± 0,0	10,30 ± 0,7

Tabela 9: Média, variância e desvio padrão do diâmetro, da espessura e da massa dos discos avaliados.

	<b>Diâmetro (cm)</b>	<b>Espessura (cm)</b>	<b>Massa (mg)</b>
<b>Média Total</b>	1,33	0,16	10,15
<b>Variância da amostra</b>	0,02	0,00	0,01
<b>Desvio-padrão da amostra</b>	0,13	0,07	3,74

Como descrito, os antibióticos foram adicionados durante a formação dos pensos, de forma a serem obtidas as concentrações pretendidas. Tendo em conta o seu peso, os que possuíam a concentração de 2,5% apresentariam uma quantidade de antibiótico entre 0,163 e 0,238 mg, os de 7,5% entre 0,375 e 0,908 mg, os de levofloxacina a 10% entre 1 e 1,06 mg e os de levofloxacina a 30% entre 2,88 e 3,3 mg (Tabela 10).

Tabela 10: Percentagem e quantidade teórica de fármaco em cada disco de quitosano.

	<b>Percentagem de fármaco (% m/m)</b>	<b>Quantidade de fármaco (mg)</b>
<b>Branco 1</b>	0	-
<b>Levofloxacina</b>	2,5	0,164±0,00
<b>Levofloxacina</b>	7,5	0,410±0,05
<b>Gentamicina</b>	2,5	0,203±0,04
<b>Gentamicina</b>	7,5	0,805±0,13
<b>Ceftriaxona</b>	2,5	0,204±0,03
<b>Ceftriaxona</b>	7,5	0,535±0,04
<b>Branco 2</b>	0	-
<b>Levofloxacina</b>	10	1,020±0,04
<b>Levofloxacina</b>	30	3,090±0,21

## IV.2 Teste de absorção de água

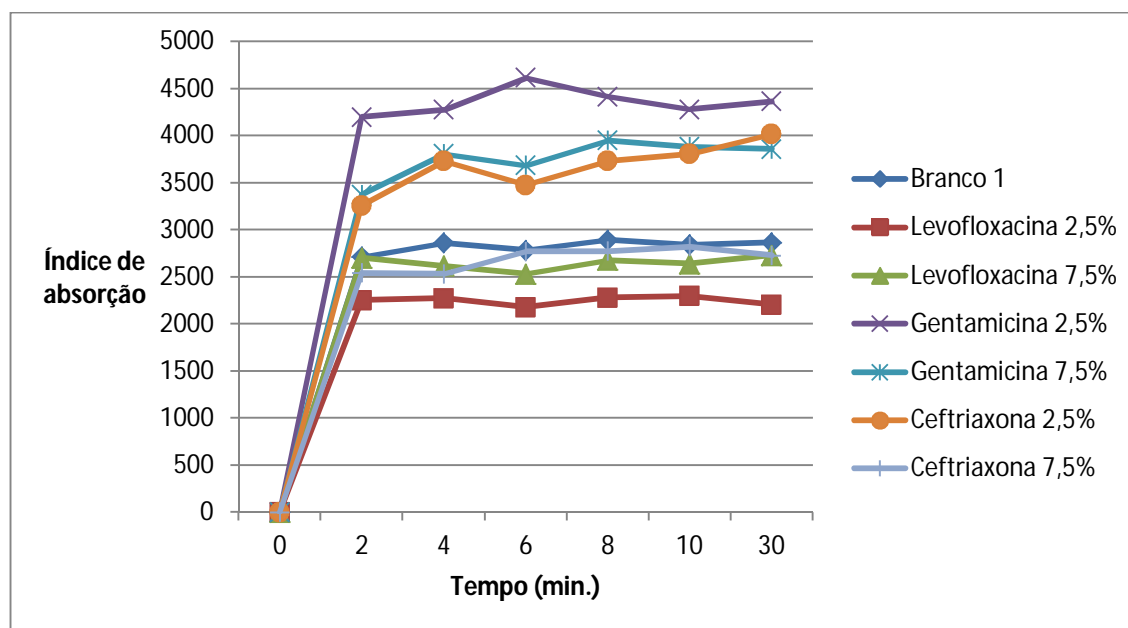
Após a pesagem inicial dos pensos e colocação em água desionizada, iniciou-se o protocolo do teste de absorção de água (Tabela 11) e cálculo do índice de absorção pela equação anteriormente descrita, tendo-se verificado que os pensos demonstraram um índice de absorção de água médio superior a 2000. A absorção de água ocorreu, maioritariamente, nos primeiros 2 a 4 minutos apresentando depois pequenas variações. Os discos mais absorventes foram os que continham gentamicina a 2,5% com um valor médio do índice de 4358 e os com um menor índice foram os de levofloxacina a 2,5%. No geral, os discos que continham levofloxacina, apresentaram um índice inferior aos restantes (Gráfico 2).

Tabela 11: Médias do índice de absorção de água a diferentes tempos após o protocolo ter tido início dos discos produzidos na primeira fase.

	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	30 min	Média
<b>Branco 1</b>	2711,1	2859,9	2780,9	2890,1	2839,5	2864,2	2824,3 ± 97
<b>Levofloxacin 2,5%</b>	2250,3	2270,2	2175,8	2278,0	2294,4	2203,9	2245,4 ± 559
<b>Levofloxacin 7,5%</b>	2698,9	2615,4	2530,9	2677,4	2637,6	2728,0	2648,0 ± 182
<b>Gentamicina 2,5%</b>	4196,9	4275,0	4617,2	4415,6	4279,7	4362,5	4357,8 ± 272
<b>Gentamicina 7,5%</b>	3374,5	3805,1	3682,1	3949,1	3879,4	3856,8	3757,8 ± 267
<b>Ceftriaxona 2,5%</b>	3256,5	3732,3	3475,2	3731,7	3806,9	4016,7	3669,9 ± 296
<b>Ceftriaxona 7,5%</b>	2541,5	2529,0	2768,9	2770,9	2820,6	2726,8	2692,9 ± 137

Ao comparar os discos de levofloxacin a 2,5% e a 7,5% e de Ceftriaxona a 7,5% com o Branco1 (Gráfico 2), verifica-se que apresentam um índice de absorção ligeiramente inferior ao controlo. Ao contrário dos discos de levofloxacin, os de gentamicina e de ceftriaxona a 2,5% apresentaram índices de absorção superiores ao ensaio em branco. Nas várias medições houve alguma variação nos pesos obtidos para cada disco.

Gráfico 2: Representação dos índices de absorção de discos de quitosano produzidos na primeira fase em tempos pré-determinados.



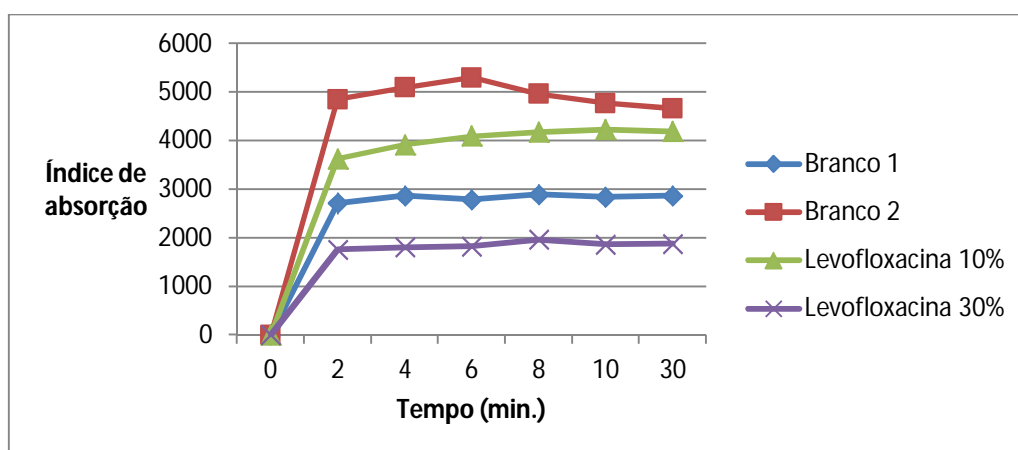
Os discos Branco2 e levofloxacin a 10% apresentaram uma média de índice de absorção superior a 4000, enquanto o de levofloxacin a 30% apresentou uma grande diferença entre as duas medições para cada tempo, apresentando uma média de 1848 (Tabela 12).

Tabela 12: Valores e médias do índice de absorção de água em tempos determinados, após iniciado o protocolo para os discos Branco2 e levofloxacina a 10% e a 30%.

	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	30 min	Média
<b>Branco</b>	4854,64	5095,88	5302,06	4967,01	4776,29	4660,82	4942,8±232
<b>Levofloxacina 10%</b>	3630,57	3917,36	4092,85	4173,14	4226,31	4184,42	4037,4±287
<b>Levofloxacina 30%</b>	1757,61	1804,99	1822,22	1962,88	1863,55	1876,86	1848,0±556

Ambos os discos de levofloxacina mostram um índice de absorção inferior ao Branco 2. Comparando com o Branco 1 e com exceção dos de levofloxacina a 30% estes discos apresentam um índice de absorção superior (Gráfico 3).

Gráfico 3: Representação dos índices de absorção de discos de quitosano em tempos pré-determinados.



Considerando apenas duas medições efetuadas, os discos de levofloxacina a 2,5% e de levofloxacina a 30% apresentaram um desvio padrão elevado de, aproximadamente, 560.

### IV.3 Determinação de pH

O pH dos discos foi verificado em dois momentos independentes, tendo os discos de levofloxacina a 7,5% e de Ceftriaxona a 7,5% sido avaliados numa segunda medição. O pH na maioria das observações situou-se entre 5,23 e 7,73 (Tabela 13); considerando que o pH medido na água utilizada variou entre 8,08 e 8,72, houve uma tendência para a sua diminuição (acidificação da solução).

Tabela 13: pH das soluções usadas para realização do teste de absorção de água.

	pH
<b>Branco 1</b>	6,86±0,1
<b>Levofloxacin 2,5 %</b>	5,99±0,5
<b>Levofloxacin 7,5 %</b>	7,73±0,2
<b>Gentamicin 2,5 %</b>	6,35±0,5
<b>Gentamicin 7,5 %</b>	5,97±0,1
<b>Ceftriaxone 2,5 %</b>	6,37±0,2
<b>Ceftriaxone 7,5 %</b>	7,53±0,5
<b>Branco 2</b>	-
<b>Levofloxacin 10 %</b>	5,37±0,3
<b>Levofloxacin 30 %</b>	5,95±0,0

#### IV.4 Estudos microbiológicos

Num primeiro passo (Tabela 14), verificou-se se os discos de quitosano com uma quantidade de gentamicina e de levofloxacin igual aos discos padrão apresentavam uma zona de inibição que se encontrasse dentro do intervalo de referência para ambas as espécies de bactérias utilizadas; apenas os discos de levofloxacin aplicados sobre *P.aeruginosa* (Figura 6) apresentaram um halo dentro do intervalo de referência. Todos os discos com gentamicina apresentaram um halo com dimensões inferiores, sendo que num dos discos aplicados sobre *S.aureus*, a zona de inibição não se verificou concentricamente em redor de todo o disco (Figura 6).

Tabela 14: Diâmetro da zona de inibição obtida com discos padrão e de quitosano na mesma quantidade de fármaco para *S.aureus* e *P.aeruginosa*.

	Diâmetro Zona de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
<b>Padrão Gentamicin</b>	21,5	20
<b>Branco+10µg de Gentamicin</b>	10,5	13,5
<b>Padrão Levofloxacin</b>	28	26
<b>Branco+5µg de Levofloxacin</b>	22,5	21

Figura 6: Imagem da zona de inibição obtida para discos padrão e de quitosano com 5  $\mu$ g levofloxacina em cultura de *P.aeruginosa* e com 10  $\mu$ g gentamicina em cultura de *S.aureus*.



Disco padrão (a) e disco de quitosano com 5 $\mu$ g de levofloxacina (b) em cultura de *P.aeruginosa*

Disco padrão (c) e disco de quitosano com 10 $\mu$ g de gentamicina (d) em cultura de *S.aureus*

De forma a verificar se as soluções utilizadas para impregnar os discos de quitosano tinham a concentração correta, colocou-se uma gota de cada solução à superfície e depositada num poço realizado com ajuda de uma pipeta de Pasteur. Verificou-se que os halos apresentavam-se dentro dos valores de referência (Tabela 15).

Tabela 15: Diâmetro da zona de inibição das soluções de levofloxacina e de gentamicina depositadas à superfície e num poço no agar.

	Diâmetro zona de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
<b>Levofloxacina</b>		
- Gota	30	27
- Poço	30	26
<b>Gentamicina</b>		
- Gota	23	21
- Poço	22	21

Numa segunda fase (Tabela 16), foram depositados sobre o agar semeado com as estirpes bacterianas os pensos de quitosano com diferentes concentrações de antibiótico. Todos os discos apresentaram um halo de inibição acima do intervalo de referência. Pode-se verificar um aumento do halo de inibição com aumento da concentração de antibiótico (sem diferença significativa), embora quando se avalia os discos de levofloxacina a 10 e a 30% pareça existir uma tendência para estagnar.

Tabela 16: Diâmetros das zonas de inibição obtidos com os discos padrão e de quitosano com diferentes concentrações de antibiótico.

Disco	Diâmetro Zona de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
<b>Padrão Gentamicina 10µg</b>	22	20
<b>Padrão Levofloxacin 5µg</b>	29	26
<b>Branco1</b>	0	0
<b>Gentamicina 2,5%</b>	24	24,5
<b>Gentamicina 7,5%</b>	28	30
<b>Levofloxacin 2,5%</b>	39	34,5
<b>Levofloxacin 7,5%</b>	42	37
<b>Branco2</b>	0	0
<b>Levofloxacin 10%</b>	45	44
<b>Levofloxacin 30%</b>	47	44

## **V. Discussão**

Na realização da parte experimental deste trabalho foram utilizados discos de quitosano com diferentes concentrações de antibiótico incorporado no início da sua produção. Pelo facto de ser a primeira vez que iriam ser criados e avaliados, foram produzidos em pouca quantidade. Desta forma, os discos disponíveis para realizar os diferentes testes foram poucos, pelo que a amostra pequena. Pelas suas características, a utilização destes discos estaria destinada a aplicação ocular em casos que necessitariam de intervenção cirúrgica com a realização, por exemplo, de tarsorrafia.

### **Características físicas**

Segundo alguns artigos, as matrizes devem ser suaves em textura e com características uniformes. Avaliando os diferentes discos verificou-se alguma variabilidade em termos de diâmetro e de espessura, devendo-se tentar uniformizar estas características no futuro, principalmente, promovendo uma diminuição da espessura. No geral, os pensos de quitosano contendo antibiótico apresentaram uma estrutura homogénea. Tendo em conta os pesos dos discos, os de concentração 2,5% apresentariam uma quantidade de fármaco entre 0,163 mg e 0,238 mg, o que é superior aos 0,100mg de brimonidina alcançado por Aburahma e Mahmoud (2011). Khurana, Arora e Pawar (2012) referem valores para pensos de gatifloxacina entre 0,718 e 0,867 mg e Pawar, Gadhave, Jadhav e Galkwad (2012) atingiram valores entre 0,969 e 0,988 mg para discos de ciprofloxacina. Contudo, os pensos após incorporação com os antibióticos ainda passam por várias lavagens. Segundo um trabalho realizado também com estes discos de quitosano com levofloxacina a 2,5 e a 7,5% estimou-se que as perdas de antibiótico durante as lavagens seriam entre 60 e 70%, sendo a quantidade de fármaco final menor ao pretendido inicialmente (R. Galante, L. Pinto e A.P. Serro. comunicação pessoal, Agosto, 2013).

### **Teste de absorção de água e determinação do pH**

A absorção de água pelo polímero é importante nas propriedades de bioadesão e de libertação do fármaco. A bioadesão começa logo após a hidratação, enquanto a libertação do fármaco ocorre após o disco atingir o estado de equilíbrio. Todos os discos absorveram a água nos primeiros minutos e atingiram índices de absorção superiores a 2000 na maioria dos casos. Este valor é muito superior aos documentados noutros estudos. Num estudo com a utilização de quitosano para formar pensos oculares, o índice de absorção situou-se entre 900 e 1400 (Aburahma e Mahmoud, 2011), enquanto que noutros estudos, sem utilização de quitosano na



matriz, o índice de absorção foi muito inferior a estes valores (Khurana et al., 2013; Gilhotra et al., 2011).

Os discos mais absorventes foram os constituídos por gentamicina e ceftriaxona 2,5%, o que está de acordo com o facto destas moléculas serem hidrossolúveis, ao contrário da levofloxacin. Os discos obtidos numa segunda fase foram produzidos não com 1%, mas 2% de PVP, um composto hidrossolúvel, que pode ter contribuído para o aumento no índice de absorção destes discos. O facto do disco de levofloxacin a 30% ter apresentado um índice de absorção muito inferior ao de 10% e ao Branco 2 pode dever-se à grande concentração de levofloxacin contudo, deve-se considerar que apenas foi avaliado um disco. Esta circunstância pode justificar o baixo índice de absorção dos discos contendo ceftriaxona a 7,5% e a diferença entre as duas medições de levofloxacin a 2,5% e a 30%, diferença essa devida ao acaso ou a alguma não uniformidade da produção dos discos. A variação no índice de absorção que se verificou nas várias medições de cada disco pode dever-se a uma menor ou maior absorção da água de superfície pelo papel absorvente ou a maior perda quando se segurava com a pinça, visto que os discos ao serem manuseados e apertados perdiam parte da água absorvida. Um índice de absorção elevado deve-se provavelmente à utilização de pensos de quitosano absorventes para formação dos discos, e que tem como implicação a colocação de soro fisiológico no disco antes da sua aplicação, de forma a evitar a desidratação da superfície ocular. A não retenção de água e a libertação quando aplicada pressão sobre o disco pode levar a uma perda importante de antibiótico.

O pH variou entre 5,23 e 7,73. Maggs (2001d) indica que uma variação de pH entre os 3,5 e os 10,5 em colírios oculares, seria seguro para a sua aplicação. A diferença verificada entre as duas medições realizadas em dois tempos diferentes, pode-se dever a erros técnicos, como o tempo de permanência na água ou à má calibração do equipamento. O facto do pH apresentar-se mais ácido pode dever-se ao acaso, ou à não neutralização completa dos discos de quitosano.

### **Estudos microbiológicos**

Para os estudos microbiológicos apenas foram utilizados os discos de gentamicina e de levofloxacin, visto não se ter conseguido obter os discos padrão de ceftriaxona, necessários para validar os testes.

A primeira etapa dos estudos microbiológicos permitiu comparar a difusão dos discos de quitosano com os discos padrão, permitindo verificar que, tendo em conta a diferente

composição, a difusão foi diferente. O diâmetro da zona de inibição inferior ao intervalo de referência pode indicar que ocorre uma difusão mais lenta nos discos de quitosano, devido a um possível aprisionamento das moléculas do fármaco nas cadeias de quitosano. O facto de um dos discos com gentamicina não ter apresentado difusão concêntrica pode dever-se a uma absorção não uniforme da gota com a solução de antibiótico. No caso do halo de inibição para a gota de levofloxacina, o valor obtido superior ao intervalo de referência, pode ser devido a erro de leitura do operador.

Na segunda etapa, verificou-se que todos os discos de quitosano com antibiótico apresentaram uma zona de inibição semelhante ou superior ao intervalo de referência, permitindo concluir que a concentração de antibiótico libertado durante 24 horas será suficiente para inibir o crescimento destes microrganismos. Sendo os microrganismos testados, os mais frequentes em infeções oculares, os resultados sugerem que estes discos podem ser aplicados nestas afeções. O aumento da concentração de antibiótico no disco é acompanhado com o aumento da zona de inibição para os discos de levofloxacina e gentamicina. Considerando os discos de levofloxacina de 10 e 30%, o diâmetro da zona de inibição é bastante semelhante, o que pode indicar a existência de um limite para a concentração de antibiótico a partir da qual a difusão não aumenta, permanecendo o restante antibiótico no disco. Num estudo em que foram avaliados os discos de levofloxacina a 2,5 e a 7,5% colocados num volume de 5ml de NaCl a 35°C, a libertação de fármaco foi muito rápida na primeira hora (R. Galante, L. Pinto e A.P. Serro. comunicação pessoal, Agosto, 2013). Considerando que no olho a quantidade de película lacrimal é pequena e que ocorre drenagem contínua pelo aparelho lacrimal, pode-se afirmar que ocorrerá diferenças na libertação do fármaco comparando os dois métodos *in vitro* descritos acima. A libertação, em princípio, ocorreria durante mais de uma hora, mas dependendo da concentração poderá ocorrer até às 24 horas. Tendo em conta que os pensos conseguem libertar uma concentração igual ou superior à CMI em condições de um TSA, a realização de um teste de libertação contínua num volume mais pequeno poderia dar mais informações sobre o comportamento dos discos no olho.

Como os resultados indicam, os discos deverão ser mais uniformes. enquanto mais testes de libertação e citotoxicidade devem ser realizados. O desenvolvimento de pensos para libertação de antibiótico implica um estudo aprofundado e o aperfeiçoamento dos mesmos ao longo do tempo, com um aumento da concentração de fármaco, como no caso deste trabalho, ou da utilização de outras substâncias que permitem a diminuição da libertação ou de aumento de ligação do fármaco à matriz, como próximos objetivos.

## **VI. Conclusões**

O estudo de métodos que permitam uma libertação contínua de fármacos, como os antibióticos, é cada vez mais importante, de forma a reduzir o número de aplicações diárias, melhorando a eficácia do tratamento. Neste sentido têm sido avaliados vários biomateriais com boas características de biocompatibilidade e de toxicidade, sendo o quitosano um exemplo interessante.

A sua caracterização, embora a amostra fosse muito pequena, revelou que seria necessário um aperfeiçoamento em termos de uma maior uniformização de tamanho e de ligação dos fármacos à matriz, de forma a permitir uma libertação mais contínua. Mais estudos são necessários, por ventura com uma amostra maior, para uma comparação significativa e extrapolação da libertação de fármacos a nível ocular.

No futuro a esterilização dos discos deveria ser considerada, com o estudo de técnicas de esterilização que poderiam ser empregadas de forma a não diminuir a eficácia dos pensos produzidos. Neste trabalho considerou-se apenas a produção e manipulação de forma asséptica.

Não obstante, o estudo e desenvolvimento destes métodos é importante, sendo o objetivo final o de permitir um tratamento único durante o tempo necessário, evitando instalações frequentes dos fármacos que diminuem a adesão dos proprietários dos animais e, por sua vez, a eficácia do tratamento e permitindo a sua aplicação em especial em animais difíceis de manipular.

## VII. Bibliografia

- Aburahma, M.H. & Mahmoud, A.A. (2011). Biodegradable ocular inserts for sustained delivery of brimonidine tartarate: preparation and *in vitro/ in vivo* evaluation. *AAPS Pharmscitech*, 12, 1335-1347.
- Achouri, D., Alhanout, K., Piccerelle, P. & Andrieu, V. (2012). Recent advances in ocular drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, Advance online publication: 1-19.
- Aggarwal, D. & Kaur, I.P. (2005). Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system. *international journal of pharmaceutics*, 290, 155–159.
- Al-Sagheer, F.A., Al-Sughayer, M.A, Muslim, S., Elsabee, M.Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate polymers*, 77, 410-419.
- Amar, A., Ashish, K., Ajaykumar, P. & Anand, J. (2012). Formulation and evaluation of controlled release ocular inserts of betaxolol hydrochloride. *IOSR Journal of pharmacy*, 2, 34-38.
- Almeida, J.F. & Fonseca, A. (2007). Immobilization of drugs for glaucoma treatment. *Journal of materials science: materials in medicine*, 18, 2309-2317.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. & Heras, A. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current chemical biology*, 3, 203-230.
- Baldrick, P. (2010). The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 56, 290–299.
- Barnett, K. (2006a). Conjunctiva, limbus, sclera. In K. Barnett, *Diagnostic atlas of veterinary ophthalmology*. (2<sup>nd</sup> edition). (pp. 35-42). Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Barnett, K. (2006b). Cornea. In K. Barnett, *Diagnostic atlas of veterinary ophthalmology*. (2<sup>nd</sup> edition). (pp. 47-53). Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Barnett, K. (2006c). Upper and lower eyelids. In K. Barnett, *Diagnostic atlas of veterinary ophthalmology*. (2<sup>nd</sup> edition). (pp. 16-18). Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Begin, A. & Calsteren M. (1999) Antimicrobial films produced from chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 26, 63–67.
- Berezin, A., Moskalenki, Y., Chernyakov, D., Skorik, Y. & Khutoryanskiy, V. (2013). *Polymeric chitosan-based matrices for improving ocular delivery of riboflavin*. Artigo apresentado no 11th International congress of the european chitin society, Porto.
- Brooks, D.E. (2010). *Corneal emergencies in small animals*. [versão electronica]. In Proceedings of the southern european veterinary conference, Sep.30- Oct. 3, 2010 - Barcelona, Spain. Acedido em Agosto 13, 2013, em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2010/lectures/eng/Brooks1.pdf>.

- Chambers, H.F. (2004a). Aminoglycosides & spectinomycin. In B.G. Katzung, (Ed.), *Basic & clinical pharmacology*. (9<sup>th</sup> edition). (pp.764-769). McGraw Hill Companies.
- Chambers, H.F. (2004b). Beta-lactam antibiotics & other inhibitors of cell-wall synthesis. In B.G. Katzung, (Ed.), *Basic & clinical pharmacology*. (9<sup>th</sup> edition). (pp.742-747). McGraw Hill Companies.
- Chambers, H.F. (2004c). Sulfonamides, trimethoprim & quinolones. In B.G. Katzung, (Ed.), *Basic & clinical pharmacology*. (9<sup>th</sup> edition). (pp.773-781). McGraw Hill Companies.
- Cho, Y., Jang, J., Park, C.R. & Ko, S. (2000). Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules*, 1, 609-614.
- Choi, W., Ahn, K., Lee, D., Byun, M. & Park, H. (2002). Preparation of chitosan oligomers by irradiation. *Polymer degradation and stability*, 78, 533-538.
- Crispin, S. (2002a). The conjunctiva. In S. Petersen-Jones & S. Crispin (Eds.). *BSAVA Manual of small animal ophtalmology*. (2nd edition). (pp. 124-132). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Crispin, S. (2002b). The cornea. In S. Petersen-Jones & S. Crispin (Eds.). *BSAVA Manual of small animal ophtalmology*. (2nd edition). (pp. 134-151). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Crispin, S. (2002c). The lacrimal system. In S. Petersen-Jones & S. Crispin (Eds.). *BSAVA Manual of small animal ophtalmology*. (2nd edition). (pp. 105-108). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Crispin, S.M. (2005a). Conjunctiva. In S.M. Crispin, *Notes on veterinary ophtalmology* (pp. 101-105). Oxford: Blackwell publishing company.
- Crispin, S.M. (2005b). Cornea. In S.M. Crispin, *Notes on veterinary ophtalmology* (pp. 109-121). Oxford: Blackwell publishing company.
- Crispin, S.M. (2005c). Eyelids. In S.M. Crispin, *Notes on veterinary ophtalmology* (pp. 74-93). Oxford: Blackwell publishing company.
- Heidemann, S.R. (1997). The molecular and cellular basis of physiological regulation. In J.G. Cunningham, *Textbook of veterinary physiology*. (2<sup>nd</sup> edition). (pp. 16-19). Pennsylvania: W.B. Saunders Company.
- de la Fuente, M., Seijo, B. & Alonso, M.J. (2008). Bioadhesive hyaluronan-chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. *Gene therapy*, 15, 668-676.
- Donaldson, D. (2011). *Eyelid disease... medical and surgical management* [versão electronica]. In International congress of the italian association of companion animal veterinarians May 27-29, 2011, Rimini, Italy. Acedido em Agosto 13, 2013, em: <http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2011/Donaldson3.pdf?LA=1>.
- Dowling, P.M. (2006). Aminoglycosides. In S. Guiguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker & P.M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. (4th edition). (pp. 207-225). Iowa: Blackwell Publishing.

- Dowling, P.M. & Kruth, S.A. (2006). Antimicrobial therapy of selected organ systems. In S. Guiguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker & P.M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. (4th edition). (pp. 363-367). Iowa: Blackwell Publishing.
- El-Sousi, S., Nácher, A., Mura, C., Catalán-Latorre, A., Merino, V., Merino-Sanjuan, M. & Diez-Sales, O. (2013). Hydroxypropylmethylcellulose films for the ophthalmic delivery of diclofenac sodium. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 65, 193-200.
- Eljarrat-Binstock, E. & Domb, A.J. (2006). Iontophoresis: A non-invasive ocular drug delivery. *Journal of controlled release*, 110, 479 – 489.
- Falcão, A. (2006). Farmacocinética. In S. Guimarães, D. Moura & P.S. Silva, *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas: manual de farmacologia e farmacoterapia*. (5ª edição). (pp. 16). Porto: Porto Editora.
- Gao, P., Nie, X., Zou, M., Shi, Y. & Cheng, G. (2011). Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system. *The journal of antibiotics*, 64, 625-634.
- Gilhotr, R.M., Gilhotr, N. & Mishra, D.N. (2010). A hydrogel-forming bioadhesive ocular minitabket for the management of microbial keratitis. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 5, 19-25.
- Gilhotra, R.M., Nagpal, K. & Mishra, D.N. (2011). Azithromycin novel drug delivery system for ocular application. *International journal of pharmaceutical investigation*, 1, 22-28.
- Glaze, M.B.. (2012). *Deep canine corneal ulcers* [versão electronica]. In Western veterinary conference, 2012. Acedido em Agosto 13, 2013, em: [www.vin.com/members/proceedings/proceedings.plx?CID=WVC2012&PID=86144&O=VIN](http://www.vin.com/members/proceedings/proceedings.plx?CID=WVC2012&PID=86144&O=VIN).
- Gould, D. (2002). Ophthalmic drugs. In S. Petersen-Jones & S. Crispin (Eds.). *BSAVA Manual of small animal ophthalmology*. (2nd edition). (pp. 50-54). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Guiguère, S. (2006). Antimicrobial drug action and interaction: an introduction. In S. Guiguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker & P.M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. (4th edition). (pp. 3-9). Iowa: Blackwell Publishing.
- Guimarães, S. (2006). Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. In S. Guimarães, D. Moura & P.S. Silva, *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas: manual de farmacologia e farmacoterapia*. (5ª edição). (pp. 666-670). Porto: Porto Editora.
- Guimarães, S. (2006). Quinolonas. In S. Guimarães, D. Moura & P.S. Silva, *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas: manual de farmacologia e farmacoterapia*. (5ª edição). (pp. 700-706) Porto: Porto Editora.
- Gupta, H., Jain, S., Mathur, R., Mishra, A.K. & Valpandian, T. (2007). Sustained ocular drug delivery from a temperature and pH triggered novel in situ gel. *Drug delivery*, 14, 507-515. Resumo retirado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18027180>.

- Gupta, H., Aqil, M., Khar, R.K., Ali, A., Bhatnagar, A. & Mittal, G. (2011). Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Journal of drug targeting*, 19, 409-417.
- Gupta, H., Aqil, M., Khar, R.K., Ali, A., Bhatnagar, A. & Mittal, G. (2013). Nanoparticles laden in situ gel for sustained ocular drug delivery. *Journal of pharmacy and bioallied sciences*, 5, 162-165.
- Hartmann, A.D., Hawley, J., Werckenthin, C., Lappin, M.R. & Hartmann, K. (2010). Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. *Journal of feline medicine and surgery*, 12, 775-82.
- Hathout, R.M., Mansour, S., Mortada, N.D. & Guinedi, A.S. (2006). Liposomes as an Ocular Delivery System for Acetazolamide: In Vitro and In Vivo Studies. *AAPS PharmSciTech*, 8.
- Helander, I.M., Nurmiaho-Lassila, E., Ahvenainen, R., Rhoades, J. & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *International journal of food microbiology*, 71, 235-244.
- Hima Bindu, T.V.L., Vidyavathi, M., Kavitha, K., Sastry, T.P. & Suresh Kumar, R.V. (2010). Preparation and evaluation of chitosan-gelatine composite films for wound healing activity. *Trends in biomaterials and artificial organs*, 24, 123-130.
- Huang, M., Khor, E. & Lim, L. (2004). Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical research*, 21, 344-353.
- Huang, S. & Fu, X. (2010). Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *Journal of controlled release*, 142, 149-159.
- Jeon, Y.J. & Kim, S.K. (2002). Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system. *Journal of microbiology and biotechnology*, 12, 503-507.
- Kaur I.P., Aggarwal D., Singh H., Kakkar S. (2010). Improved ocular absorption kinetics of timolol maleate loaded into a bioadhesive niosomal delivery system. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 248, 1467-72.
- Kean, T. & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced drug delivery reviews*, 62, 3-11.
- Khanal, D.R., Choontanom, P., Okamoto, Y., Minami, S., Rakshit, S.K., Chandrakrachang, S., Stevens, W.F. (2000). Management of fracture with chitosan in dogs. *Indian veterinary journal*, 77, 1085-1089.
- Khurana, G., Arora, S. & Pawar, P. (2012). Ocular insert for sustained delivery of gatifloxacin sesquihydrate: preparation and evaluations. *International journal of pharmaceutical investigation*, 2, 70-77.
- Kim, S. & Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate polymers*, 62, 357-368.

- Kurita, K. (2006) Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine biotechnology*, 8, 203–226.
- Laranjeira, M.C.M. & Fávere, V.T. (2009). Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química nova*, 32, 672-678.
- Ledbetter, E.C., Hendricks, L.M. Riis, R.C. & Scarlett, J.M.(2007). In vitro fluoroquinolone susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with ulcerative keratitis. *American journal of veterinary research*, 68, 638-642.
- Ledbetter, R.C., Mun, J.J., Kowbel, D. & Fleiszig, S.M. (2009). Pathogenic phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spontaneous canine ocular infections. *Investigate ophtalmology & visual science*, 50, 729-736.
- Li, N., Zhuang, C., Wang, M., Sun, X., Nie, S. & Pan, W. (2009). Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. *International journal of pharmacology*, 379, 131-138.
- Li, X., Chen, S., Zhang, B., Li, M., Diao, K, Zhang, Z., Li, J., Xu, Y., Wang, X. & Cen, H. (2012). In situ injectable nano-composite hydrogel composed of curcumin, N,O-carboxymethyl chitosan and oxidized alginate for wound healing application. *International journal of pharmacology*, 437, 110-119.
- Lin, C.T. & Peterson-Jones, S.M. (2007). Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from corneal ulcers of dogs in Taiwan. *Journal of small animal practice*, 48, 271-274.
- Lin, C.T. & Petersen-Jones, S.M. (2008). Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from cats with ulcerative keratitis in Taiwan. *Journal of small animal practice*, 49, 80–83.
- Liu, X.F., Guan, Y.L., Yang, D.Z., Li, Z. & Yao, K. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of applied polymer science*, 79, 1324–1335 .
- Liu, J., Zhang, J. & Xia, W. (2008). Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo. *Food chemistry*, 107, 419–425.
- Ludwig, A. (2005). The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 57, 1595– 1639.
- Maddison, J.E. & Watson, A.D. (2002). Antibacterial drugs. In J.E.Maddison, S.W. Page & D. Church (Eds.), *Small animal clinical pharmacology*. (pp. 115-146).. London: W.B. Saunders.
- Maggs, D.J. (2001a). Conjunctiva. In D. Slatter, *Fundamentals of veterinary ophtalmology* (3rd edition). (pp.135-143). Philadelphia: Saunders.
- Maggs, D.J. (2001b). Cornea and sclera. In D. Slatter, *Fundamentals of veterinary ophtalmology* (3rd edition). (pp.175-190). Philadelphia: Saunders.
- Maggs, D.J. (2001c). Eyelids. In D. Slatter, *Fundamentals of veterinary ophtalmology* (3rd edition). (pp.107-108). Philadelphia: Saunders.
- Maggs, D.J. (2001d). Ocular pharmacology and therapeutics. In D. Slatter, *Fundamentals of veterinary ophtalmology* (3rd edition). (pp.33-43). Philadelphia: Saunders.



- Mehanna, M.M., Elmaradny, H.A. & Samaha, M.W. (2010). Mucoadhesive liposomes as ocular delivery system: physical, microbiological, and in vivo assessment. *Drug development and industrial pharmacy*, 36, 108-118. Resumo retirado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19656004>.
- Merriam- Webster's online dictionary (2013). *Biodegradable*. Acedido em: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/biodegradable>
- Miller, P.E. (2001). Lacrimal system. In D. Slatter, *Fundamentals of veterinary ophtalmology* (3rd edition). (pp.157-165). Philadelphia: Saunders.
- Minagawa, T., Okamura, Y., Shigemasa, Y., Minami, S. & Okamoto, Y. (2007). Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydrate polymers*, 67, 640–644.
- Montero, J.G. & Brandão, F. (2006). Aminoglicosídeos. In S. Guimarães, D. Moura & P.S. Silva, *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas: manual de farmacologia e farmacoterapia*. (5ª edição). (pp. 686-692). Porto: Porto Editora.
- Moore, C.P. (2001). Ophtalmic pharmacology. In H.R. Adams (Ed.), *Veterinary pharmacology and therapeutics*. (8th edition). (pp.1120-1131). Iowa: State University Press.
- Morales, A., Valinhos, M.A.R., Salvadego, M. & Levy, C.E. (2009). *Microbiological and clinical aspects of corneal ulcers in dogs*. Artigo apresentado no 34th World Small Animal Veterinary Congress 2009, São Paulo, Brasil.
- Motwani, S.K., Chopra, S., Talegaonkar, S., Kohli, K., Ahmad, F.J., Khar, R.K. (2008). Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 68, 513–525.
- Muzzarelli, R., Orlandini, F., Pacetti, D., Boselli, E., Frega, N., Tosi, G. & Muzzarelli, C. (2006). Chitosan taurocholate capacity to bind lipids and to undergo enzymatic hydrolysis: An in vitro model. *Carbohydrate polymers*, 66, 363–371.
- Okamoto, Y., Watanabe, M., Miyatake, K., Morimoto, M., Shigemasa, Y., & Minami, S. (2002a). Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of fibroblasts and vascular endothelium. *Biomaterials*, 23, 1975–1979 .
- Okamoto, Y., Kawakami, K., Miyatake, K., Morimoto, M., Shigemasa, Y. & Minami, S. (2002b). Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate polymers*, 49, 249–252.
- Okamoto, Y., Yano, R., Miyatake, K., Tomohito, I., Shigemasa, Y. & Minami, S. (2003). Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate polymers*, 53, 337-342.
- Pangburn, S., Trescony, P. & Heller, J. (1982). Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials*, 3, 105-108.
- Papich, M.G. & Riviere, J.E. (2001). Fluoroquinolone antimicrobial drugs. In H.R. Adams (Ed.), *Veterinary pharmacology and therapeutics*. (8th edition). (pp.898-909). Iowa: State University Press.

- Papich, M.G. *Strategies for using antibiotics in animals*. Acedido em Agosto 21, 2013 em <http://www.vetlatranquera.com.ar/pages/wsava2002/Pharmacology06.htm>
- Pawar, S.D., Gadhave, M.V., Jadhav, S.L. & Gaikwad, D.D. (2012). Design and evaluation of polymeric ocular drug delivery system for controlled delivery of ciprofloxacin hydrochloride. *Journal of drug delivery & therapeutics*, 2, 49-52.
- Petersen-Jones, S. (2002). The eyelids and nictitating membrane. In S. Petersen-Jones & S. Crispin (Eds.). *BSAVA Manual of small animal ophthalmology*. (2nd edition). (pp. 91-94). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Prashanth, K.V.H. & Tharanathan, R.N. (2007). Chitin / Chitosan: modifications and their unlimited application potential, an overview. *Trends in food science & technology*, 18, 117-131.
- Prescott, J.F. (2006). Beta-lactam antibiotics: cephalosporins. In S. Guiguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker & P.M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. (4th edition). (pp. 139-149). Iowa: Blackwell Publishing.
- Quin, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. & Leonard, F.C. (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*. Oxford: Blackwell Science.
- Raafat, D., Barga, K., Haas, A. & Sahl, H. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and environmental microbiology*, 74, 3764–3773.
- Raghuwanshi, N., Dikshit, S., Sharma, A., Upamanyu, N., Dubey, A. & Pathak, A. (2012). Formulation and evaluation of niosome-encapsulated levofloxacin for ophthalmic controlled delivery. *International journal of advances in pharmaceutical research*, 3, 901 – 906.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31, 603-632.
- Riviere, J.E. & Spoo, J.W. (2001). Aminoglycoside antibiotics. In H.R. Adams (Ed.), *Veterinary pharmacology and therapeutics* (8th edition). (pp.841-855). Iowa: State University Press.
- Rodrigues, S., Dionísio, M., López, C.R. & Grenha, A. (2012). Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. *Journal of functional biomaterials*, 3, 615-641.
- Sahay, G., Aćakhova, D.Y. & Kabanov, A.V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release*, 145, 182–195.
- Samuelson, D.A. (2013). Ophthalmic anatomy. In K. Gelatt, B. Gilger, & T. Kern (Eds.), *Veterinary ophthalmology: Volume 1*. (5th ed.). (pp. 46-72). [Pré-visualização]. USA: John Wiley & Sons, Inc. Acedido em Agosto 1, 2013 em Google books: <http://books.google.pt/books?id=GcRvWhvpUU0C&printsec=frontcover&hl=pt-PT#v=onepage&q&f=false>
- Sánchez, M.J. (2003). The potential of chitosan in ocular drug delivery. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 55, 1451-1463.

- Sanjay, D.L., Chetan, C.A., Karmendu, B.P. & Sanket, D.G. (2010). Development of sustained ocular delivery of levofloxacin from pH triggered in situ gelling system. *Inventi Impact: NDDS*, 2010. Resumo retirado de: <http://www.inventi.in/Article/ndds/80/10.aspx>.
- Santos, L.G.F., Almeida, A.B.F., Silva, M.C., Oliveira, J.T., Dutra, V. & Sousa, R.F. (2009). Microbiota conjuntival de cães hígidos e com afecções oftálmicas. *Acta scientiae veterinariae*, 37, 165-169.
- Senel, S. & McClure, S. (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 56, 1467-1480.
- Shigemasa Y, Saito K, Sashiwa H & Saimoto H. (1994). Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *International journal of biological macromolecules*, 16, 43-49.
- Short, B.G. (2008). Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. *Toxicologic pathology*, 36, 49-62.
- Siepmann, F., Siepmann, J., Walther, M., MacRae, R.J. & Bormeier, R. (2008). Polymer blends for controlled release coatings. *Journal of controlled release*, 125, 1-15.
- Slatter, D. (2001). *Fundamentals of veterinary ophthalmology* (3rd edition). (pp.135-143). Philadelphia: Saunders
- Smith, J., Wood, E., Dornish, M. (2004). Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharmaceutical research*, 21, 43-9.
- Stanley, R.G. (2002). Ocular clinical pharmacology. In J.E.Maddison, S.W. Page & D. Church (Eds.), *Small animal clinical pharmacology*. (pp. 515-526). London: W.B. Saunders.
- Subtil, A.D.O. (2010). *Bacteriologia ocular em canídeos – estudo retrospectivo 2002-2010*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Sueke, H., Kaye, S., Neal, T., Murphy, C., Hall, A., Whittaker, D., Tuft, S. & Parry, C. (2010). Minimum inhibitory concentrations of standard and novel antimicrobials for isolates from bacterial keratitis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51, 2519-2524.
- Szatmári, V. (2012). *Chitosan (HemCon) patch effectively controls hemorrhage from femoral arterial puncture site in dogs after removal of a large-bore introducer-sheath*. In Congress of the european college of veterinary internal medicine - companion animals Setembro 6-8, Maastricht. Resumo acedido em Julho de 2013 em: <http://www.vin.com/members/proceedings/Proceedings.plx?CID=ECVIM2012&Category=12699&PID=84845&O=VIN>
- Thakur, R.R. & Kashiv, M. (2011). Modern delivery systems for ocular drug formulations: A comparative overview W.R.T. conventional dosage form. *International journal of research in pharmaceutical and biomedical science*, 2, 8-18.
- Tolar, E.L., Hendrix, D.V., Rohrbach, B.W., Plummer, C.E., Brooks, D.E. & Gelatt, K.N. (2006). Evaluation of clinical characteristics and bacterial isolates in dogs with

- bacterial keratitis: 97 cases (1993–2003). *Journal of the american veterinary medical association*, 228, 80-85.
- Ueno, H., Mori, T. & Fujinaga, T. (2001). Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced drug delivery reviews*, 52, 105–115.
- Ueno, H., Ohya, T., Ito, H., Kobayashi, Y., Yamana, K. & Sato, M. (2007). Chitosan application to X-ray irradiated wound in dogs. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*, 60, 304-310.
- Vaden, S.L. & Riviere, J.E. (2001). Penicillins and related  $\beta$ -lactam antibiotics. In H.R. Adams (Ed.), *Veterinary pharmacology and therapeutics*. (8th edition). (pp.822-825). Iowa: State University Press.
- Vaden, S.L. (2010). *Effective management of familial renal diseases in dogs and cats* (part 1 - 2). [versão electronica]. In International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians SCIVAC, May, 28-30, Rimini, Italy. Acedido em Agosto 13, 2013, em: <http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2010/Vaden2.pdf?LA=1>.
- Varshosaz, J., Tabbakhian, M. & Salmani, Z. (2008). Designing of a thermosensitive chitosan/poloxamer *in situ* gel for ocular delivery of ciprofloxacin. *The open drug delivery journal*, 2, 61-70.
- Venkata, R.G., Madhavi, S. & Rajesh, P. (2011). Ocular drug delivery: an update review. *International journal of pharmacy and biological sciences*, 1, 437-446.
- Verestiuc, L., Nastasescu, O., Barbu, E., Sarvaiya, I., Green, K.L. & Tsibouklis, J. (2006). Functionalized chitosan/NIPAM (HEMA) hybrid polymern networks as inserts for ocular drug delivery: synthesis, *in vitro* assessment, and *in vivo* evaluation. *Journal of biomedical materials research*, 77A, 726–735.
- Walker, R.D. (2006). Antimicrobial susceptibility testing methods and interpretation of resulst. In S. Guiguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker & P.M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. (4th edition). (pp. 11-24). Iowa: Blackwell Publishing.
- Walker, R.D. & Dowling, P.M. (2006). Fluoroquinolones. In S. Guiguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker & P.M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. (4th edition). (pp. 263-281). Iowa: Blackwell Publishing.
- Walker, R.D. & Guiguère, S. (2006). Principles of antimicrobial drug selection and use. In S. Guiguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker & P.M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. (4th edition). (pp. 107-120). Iowa: Blackwell Publishing.
- Wang, X., Ma, J., Wang, Y. & He, B. (2002). Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 23, 4167-76.
- Wang, L., Pan, Q., Zhang, L., Xue, Q., Cui, J. & Qi, C. (2008). Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. *Veterinary ophthalmology*, 11, 145-149.

- Weiner, A.L. & Gilbert, B.C. (2010). Advancements in ocular drug delivery. *Veterinary ophthalmology*, 13, 395-406.
- White, D. (2008). *What's new in topical wound management?*. [versão electronica]. In Wound Management, Proceeding of the SEVC Southern European Veterinary Conference, Oct. 17-19, 2008, Barcelona, Spain Sevc, Acedido em Agosto 13,2013 em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2008/white4.pdf>
- Williams, D.F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29, 2941–2953.
- William, D.F. (2013). *Biomaterials*. Acedido em Julho 10, 2013, disponível em: <http://www.journals.elsevier.com/biomaterials/>.
- Zhang, J. & Wang, S. (2009). Topical use of coenzyme Q10-loaded liposomes coated with trimethyl chitosan: tolerance, precorneal retention and anti-cataract effect. *International journal of pharmaceutics*, 37, 66-75.
- Zhang, J. Xia, W., Liu, P., Cheng, Q., Tahirou, T., Gu, W. & Li, B. (2010). Chitosan modification and pharmaceutical/ biomedical applications. *Marine drugs*, 8, 1962-1987.
- Zhou, K., Xia, W., Zhang, C. & Liangli, Y. (2006). In vitro binding of bile acids and triglycerides by selected chitosan preparations and their physico-chemical properties. *LWT- Food science and technology*, 39, 1087–1092.

## Anexo 1 – Atividades desenvolvidas durante o estágio

Tabela 17: Frequência relativa dos casos clínicos observados no serviço de consultas.

Área	Frequência Relativa (%)
Medicina Preventiva	29,9
Gastroenterologia	11,7
Dermatologia	10,9
Doenças infecciosas	5,8
Neurologia	4,4
Oftalmologia	4,4
Estomatologia e odontologia	3,6
Urologia e nefrologia	3,6
Cardiologia	2,9
Pneumologia	2,2
Oncologia	1,5
Endocrinologia	0,7
Ortopedia	0,7
Otorringolaringologia	0,7
Reprodução e obstetrícia	0,7
Outra	16,1

Tabela 18: Frequência relativa dos casos clínicos observados no serviço de cirurgia.

Área	Frequência relativa (%)
Tecidos moles	63,4
Ortopedia	15
Odontologia	10,8
Oftalmologia	6,5
Meios de diagnóstico	4,3

Tabela 19: Frequência relativa dos casos clínicos observados no serviço de internamento.

<b>Área</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
<b>Cirurgia</b>	20,4
<b>Nefrologia e Urologia</b>	15,8
<b>Gastroenterologia</b>	13,6
<b>Traumatologia</b>	12,2
<b>Neurologia</b>	5,9
<b>Pneumologia</b>	4,5
<b>Doenças infecciosas</b>	4,1
<b>Doenças parasitárias</b>	3,2
<b>Oncologia</b>	3,2
<b>Reprodução e obstetrícia</b>	2,3
<b>Toxicologia clínica</b>	2,3
<b>Cardiologia</b>	1,8
<b>Endocrinologia</b>	1,8
<b>Oftalmologia</b>	1,8
<b>Estomatologia e Odontologia</b>	0,9
<b>Dermatologia</b>	0,5
<b>Hematologia</b>	0,5
<b>Ortopedia</b>	0,5
<b>Outra</b>	5,0